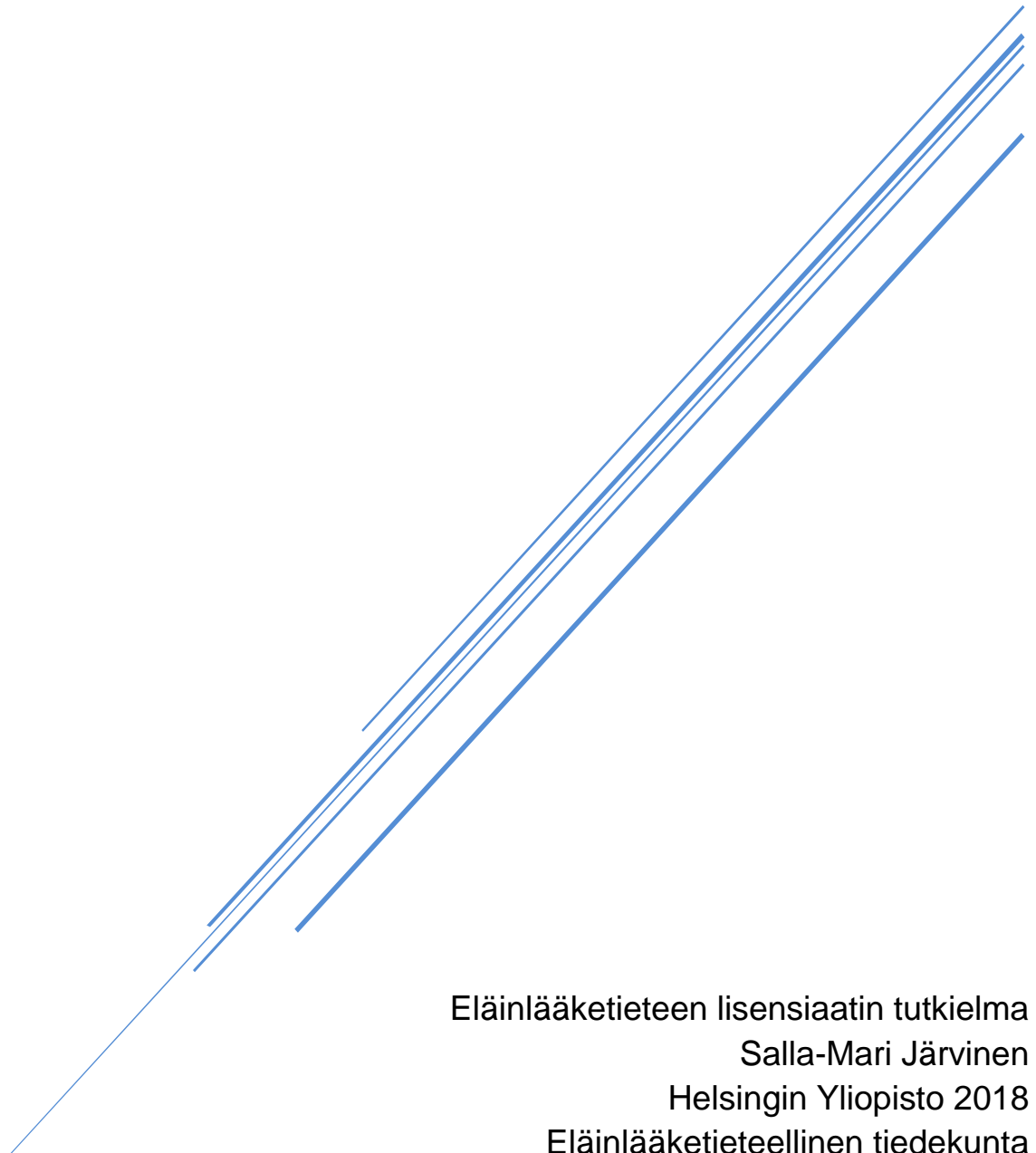


Kissan ulosteen viromi



Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma
Salla-Mari Järvinen
Helsingin Yliopisto 2018
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto
Mikrobiologian oppiaine



Tiedekunta - Fakultet - Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning – Department Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto	
Tekijä - Författare - Author Salla-Mari Järvinen			
Työn nimi - Arbetets titel - Title Kissan ulosteen viromi			
Oppiaine - Läroämne - Subject Mikrobiologian oppiaine			
Työn laji - Arbetets art - Level Lisensiaatin tutkielma	Aika - Datum - Month and year 03/2018	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 38	
<p>Tiivistelmä - Referat – Abstract</p> <p>Kissoilla esiintyy monia ruoansulatuskanavan viruksia. Taudinaiheuttajasta riippuen osa tartunnoista voivat olla täysin oireettomia, mutta myös kuolemaan johtavia tartuntoja esiintyy. Ihmiselle tautiriskin voi aiheuttaa esimerkiksi kissojen rotavirukset.</p> <p>Uuden sukupolven sekvensointimenetelmiä (Next-generation sequencing, NGS) käyttämällä voidaan sekvensoida viruksen koko perimä eli genomi nopeasti yhdellä kerralla. NGS:ää käytettäessä sekvensointi voidaan tehdä ilman ennakkotietoja ja täten löytää myös aiemmin tuntemattomia viruksia. Suomalaisen kissojen virusten esiintyvyydestä ei ole aikaisemmin tehty kattavia tutkimuksia.</p> <p>Työn tavoitteena oli tutkia, mitä viruksia löytyy terveiden ja ripuloivien kissojen ulosteista Suomessa. Tutkimuksessa analysoitiin yhteensä 15 kpl kissojen ulostenäytteitä, joista yhdeksän oli eläinsuojeluyhdistyksen kissaa ja kuusi lemmikkikissaa. Kahdeksalla kissalla oli esiintynyt ruoansulatuskanavan oireita.</p> <p>Työhön kuului nukleiinihappojen eristys kissojen ulosteista. Esikäsittelyn avulla pyrittiin poistamaan ulosteesta bakteerit, jonka jälkeen näytteistä tehtiin kirjasto, joka sekvensoitiin Illumina Miseq-laitteistolla. Data analysoitiin bioinformatiikan avulla, johon kuului muun muassa huonolaatuisten sekvenssien poisto ja yhdistelmäsekvenssien eli contigien koostaminen lyhyistä sekvensseistä. Contigit käännettiin aminohapposekvenssiksi, joille etsittiin vastaavaa sekvenssiä geenipankista. Löydettyjen virusten nimet perustuivat geenipankkisekvenssien nimiin.</p> <p>Näytteistä löydettiin yhteensä kuusi virusta, joista kaksi esiintyi samalla kissalla. Yhdestä näytteestä löydettiin täysi vastaavuus kissan panleukopenia virukseen (FPV). Kissa oli saanut yhden rokotuksen ennen näytteiden keräämistä eikä kissalla ollut minkäänlaisia oireita. Löydetty virus ei ollut täysin identtinen rokotekantojen virusten kanssa, mutta ero ei ollut suuri. Taustalla voi olla luonnollinen tartunta tai esimerkiksi heikentyneen immuunivasteen aiheuttama rokotekannan pitkäaikainen replikoituminen. Yhdestä näytteestä löydettiin circovirukseen vastaavaa sekvenssiä ja lisäksi tunnistamaton virus, jonka sekvenssi vastasi myös circovirusta. Circovirusten tiedetään aiheuttavan ruoansulatuskanavaoireita, mutta kissoilta ei ole aiemmin todettu tartuntoja. Löydetty virus voi olla aiemmin tunnistamaton kissojen oma circovirus, mutta lisätutkimuksia tulisi tehdä asian varmentamiseksi. Viruksen yhteys ripuliin on myös epäselvä. Muut löydetty virukset olivat todennäköisesti peräisin ruoasta tai esimerkiksi RNA-eristyskolumnista.</p> <p>Ulosteista löytyneiden virusten määrä oli pieni eikä suuria johtopäätöksiä pystytäkään tekemään näytteiden vähäisen lukumäärän vuoksi. Kuitenkin ulkomailla tehdyissä ulosteen viromia selvittävässä tutkimuksessa vastaavilla kissamäärillä on löydetty huomattavasti enemmän viruksia kuin tässä tutkimuksessa. Tulevaisuudessa suuremmalla kissamäärällä tehty tutkimus vertaillen eroavaisuuksia maantieteellisesti sekä sisä- ja ulkokissojen välillä, antaisi luotettavampaa dataa Suomen tilanteesta. NGS:n käyttäminen ulosteen viromin selvittämiseksi vaikuttaisi olevan käyttökelpoinen tutkimusmenetelmä.</p>			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords uuden sukupolven sekvensointi, NGS, uloste, kissa, viromi, metagenomiikka			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktor och ledare - Director and Supervisor(s) Johtaja prof. Olli Vapalahti, ohjaaja Teemu Smura			

SISÄLLYS

1 JOHDANTO.....	1
2 KIRJALLISUUSKATSAUS.....	2
2.1 Tunnetut kissojen ruoansulatuskanavan virukset.....	2
2.1.1 Panleukopenia virus	2
2.1.2 Koronavirus	6
2.1.3 Leukemiavirus	11
2.1.4 Kissan immuunikatovirus.....	14
2.1.5 Rotavirus	15
2.1.6 Kalikivirukset	17
2.1.7 Astrovirukset.....	18
2.1.8 Adenovirukset.....	18
2.2 Uuden sukupolven sekvensointi tekniikka	19
2.2.1 Kissoilla tehdyt NGS-tutkimukset	20
3 TUTKIMUS	21
3.1 Tutkimusaineisto	21
3.2 Tutkimusmenetelmät	22
3.3 Tulokset.....	26
4 POHDINTA.....	27
KIITOKSET	30
5 LÄHDELUETTELO	31

1 JOHDANTO

Kissa on yksi maailman yleisimmistä kotieläimistä. Aikaisemmin kissoja on käytetty muun muassa tuholaiistorjunnan apuna maaseudulla, mutta nykyään kissoja pidetään enemmän sisätiloissa kuin aikaisemmin pelkästään lemmikkieläiminä. Sekä sisä- että ulkokissat viettävät omistajien kanssa aikaa samoissa tiloissa. Varsinkin sisäkissat voivat olla omistajien kanssa läheisessä kontaktissa esimerkiksi syömällä keittiössä, hyppäämällä syliin sekä nukkuen omistajansa kanssa sängyssä.

Kissoilla esiintyy monia eri ruoansulatuskanavan viruksia. Osa virustartunnoista voi olla täysin oireettomia, mutta myös vakavia kuolemaan johtavia tartuntoja esiintyy taudin aiheuttajasta riippuen (Sykes 2014). Lisäksi osa kissojen viruksista saattaa aiheuttaa tautiriskin myös ihmisille, esimerkiksi rotaviruksen tapauksessa (Squires 2003, Tsugawa ja Hoshino 2008, Fredj ym. 2013). Ruoansulatuskanavaan voi päätyä myös muualla elimistössä lisääntyviä viruksia, erityisesti jos kyseessä on yleistynyt tulehdustila.

Virusdiagnostiikka on laajentunut huomattavasti viimeisten vuosien aikana ja erityisesti uuden sukupolven sekvensointimenetelmät (Next-generation sequencing, NGS) ovat nopeita ja mahdollistavat viruksen koko perimän eli genomin sekvensoinnin yhdellä kerralla (Barzon ym. 2013). Menetelmänä NGS ei rajoitu PCR-tutkimuksen tavoin ainoastaan muutaman fragmentin käsittelemiseen. Lisäksi PCR:ää käytettäessä tulee ennalta tietää tai arvata, mitä virusryhmää tai -ryhmiä näytteistä etsitään. NGS:ää käytettäessä sekvensointi voidaan tehdä ilman ennakkotietoja ja täten löytää myös aiemmin tuntemattomia viruksia (Barzon ym. 2013). Aikaisemmin kissojen suoliston viruksia on tutkittu lähinnä yksittäin PCR:n avulla. Katsauksessa Salin ja Kinnunen (2008) esittelevät suomalaisten kissojen leukemiaviruksen (FeLV) ja kissan immuunikatoviruksen (FIV) esiintymisestä tehtyjä tutkimuksia, mutta muiden virusten esiintyvyydestä Suomessa ei ole tutkimustietoa.

Tutkielma koostuu kirjallisuuskatsauksesta sekä tutkimusosuudesta. Työn tavoitteena on käydä läpi yleisimpiä tunnettuja kissojen ruoansulatuskanavan viruksia, esitellä NGS:n avulla tehtyjä tutkimuksia, joita on tehty kissoille tähän mennessä sekä tutkia, mitä viruksia löytyy terveiden ja ripuloivien kissojen ulosteesta Suomessa NGS-menetelmää käyttäen.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Tunnetut kissojen ruoansulatuskanavan virukset

2.1.1 Panleukopenia virus

Kissojen panleukopenia virus (FPV) on *Parvoviridae*-heimoon kuuluva protoparvovirus (entinen parvovirus) (Cotmore ym. 2014), joka aiheuttaa suolistotulehdusta sekä koti-että villikissoilla maailmanlaajuisesti (MacLachlan ja Dubovi 2011, Sykes 2014). Sairautta kutsutaan nimellä kissan panleukopenia eli kissarutto. FPV on yhdistetty myös minkkien, pesukarhujen ja kettujen sairauksiin (Truyen ym. 2009, Sykes 2014) ja virus on eristetty myös ripuloivalta apinalta Kiinassa (Yang ym. 2010). Ihmistartuntoja ei ole todettu. Kooltaan FPV on pieni, yksijuosteinen, vaipaton DNA-virus, joka on läheistä sukua koirien parvovirus tyyppi 2:lle (CPV-2) (Sykes 2014) ja pidetään todennäköisenä, että CPV-2 on muuntunut FPV:stä kun virus on siirtynyt kissasta koiraan. Tällöin FPV on sopeutunut uuteen isäntälajiin ja alkanut leviämään koirapopulaatiossa (Truyen ym. 2009). CPV-2 pystyy infektoimaan myös kissoja (Decaro ym. 2010), mutta Euroopassa on tiedossa vain yksittäisiä tapauksia (Truyen ym. 2009).

FPV leviää helposti (Kruse ym. 2010), koska sairastuneet kissat erittävät virusta runsaasti ulosteisiin, virus selviytyy ympäristössä useita kuukausia (Truyen ym. 2009) ja kestää hyvin useita desinfektioaineita (Truyen ym. 2009, Sykes 2014). Suurin sairastuvuus ja kuolleisuus ovat alle 1-vuotiailla kissoilla, mutta myös aikuiset kissat voivat sairastua. Aikuiset kissoilla sairaus on yleensä lievempi tai oireeton (Kruse ym. 2010, Sykes 2014). Pennuilla kuolleisuus voi nousta jopa 90 prosenttiin (Truyen ym. 2009). Krusen ym. (2014) Saksassa vuosina 1990-2007 tehdyssä tutkimuksessa kissaruttodiagnoosin saaneista kissoista 51,1 prosenttia selvisi hengissä. Keskimääräinen ikä sairastumiselle oli neljä kuukautta eikä kukaan kissoista ollut saanut rokotuksia kissaruttoa vastaan yli 12 viikon ikäisinä. Alle 12 viikon iässä saaduilla rokotteilla ei todettu olevan vaikutusta sairastuvuuteen eikä sairaalahoidon pituuteen. Diagnoosin saaneista kissoista (244 kpl) 6,1 prosentilla ei esiintynyt minkäänlaisia ruoansulatuskanavan oireita eikä tyypillisiä verinäytelöydöksiä. (Kruse ym. 2010).

Kissa voi saada tartunnan suoraan kissan suuhun päätyneen saastuneen ulosteen kautta eli feko-oraalisesti tai epäsuorasti saastuneiden fomiittien (Sykes 2014), esimerkiksi vaatteiden, häkkien tai hyönteisten, välityksellä (Kruse ym. 2010). Epäsuora kontakti on yleisin tartunnan lähde. Kissaruttoa esiintyy tyypillisesti monikissatalouksissa ja eläinsuojissa (Truyen ym. 2009, Sykes 2014), mutta myös yksin asuvat sisäkissat voivat sairastua (Kruse ym. 2010). Virusta eritetään ulosteissa yleensä muutaman päivän ajan, mutta joillakin kissoilla erityy kestää jopa 6 viikkoa (Sykes 2014).

FPV lisääntyy ensin nenänielun imukudoksessa, josta se leviää verenkierron välityksellä elimistöön (MacLachlan ja Dubovi 2011, Sykes 2014). FPV tarvitsee lisääntyäkseen aktiivisesti jakaantuvia soluja ja tyypillisimpiä lisääntymispaikkoja ovat luuydin sekä ruoansulatuskanava. Luuytimeen edennyt tartunta aiheuttaa leukopenian eli valkosolujen vähenemisen veressä ja sitä kautta elimistön immuunijärjestelmän heikkenemisen. Suolistossa virus infektoi ohutsuolen kryptasoluja (Sykes 2014). Kryptasolujen tuhoutuminen lyhentää ohutsuolen nukkalisäkkeitä, lisää suoliston läpäisevyyttä ja johtaa imeytymishäiriöihin (MacLachlan ja Dubovi 2011, Sykes 2014).

Sairauden vakavuus riippuu iästä, immuunistatuksesta ja samanaikaisista bakteeri- tai virustartunnoista (Kruse ym. 2010, Sykes 2014), joilla on vaikutusta ohutsuolen epiteelisolujen uusiutumiseen, jolloin sekundaariset tartunnat voivat lisätä virusten lisääntymistä ja niiden aiheuttamaa solutuhoa (Sykes 2014). Bakteremia yhdessä leukopenian kanssa voi johtaa sepsikseen eli verenmyrkytykseen (Truyen ym. 2009).

Sairauden itämisaika vaihtelee 2-10 päivän välillä (MacLachlan ja Dubovi 2011, Sykes 2014). Kliiniset oireet vaihtelevat subkliinisistä tapauksista oireettomiin äkkikuolemiin (Kruse ym. 2010, Sykes 2014). Subkliinistä tartuntaa pidetään yleisempänä aikuisilla kissoilla hyvän vastustuskyvyn vuoksi (Sykes 2014). Yleisimpiä oireita ovat anoreksia, vetinen tai verinen ripuli, oksentelu, heikkous ja kuume (Kruse ym. 2010). Oireet voivat johtaa dehydraatioon eli elimistön kuivumiseen ja nopeaan painonlaskuun. Joillakin yksilöillä oireena voi olla vain anoreksia ja heikkous (Sykes 2014). Verinäytteissä yleisin löydös on leukopenia johtuen neutrofiilien ja lymfosyyttien vähyydestä (Kruse ym. 2010). Kuolemaan johtava tartunta johtuu yleensä dehydraatiosta, sekundaaristen bakteeritartuntojen aiheuttamasta sepsiksestä (Kruse ym. 2010, Sykes 2014),

elimistön elektrolyyttien epätasapainosta, hypoglykemiasta tai suoliston verenvuodosta (Sykes 2014).

FPV voi aiheuttaa muutoksia myös sikiöihin emän saadessa tartunnan. Tartunnan oireina voi olla synnynnäiset kehityshäiriöt, abortointi tai hedelmättömyys, jos tartunta saadaan alkutiineyden aikana. Yleensä emällä ei ole muita oireita (Sykes 2014). Tiineyden kahden viimeisen viikon aikana tai ensimmäisten elinviikkojen aikana saadussa tartunnassa virus aiheuttaa tuhoa pentujen pikkuaivojen Purkinjen soluissa ja jyväissolujen esiasteissa johtaen pikkuaivojen hypoplasiaan eli vajaakehitykseen (MacLachlan ja Dubovi 2011, Sykes 2014). Tartunnan vakavuus voi vaihdella samassa pentueessa eri yksilöiden välillä, osa pennuista voi menehtyä ja lopuille kehittyä eritasoisia neurologisia oireita. Pikkuaivoataksian oireet eivät ole eteneviä (Sykes 2014). Oireet havaitaan usein vasta pentujen alkaessa kävelemään 2-3 viikon iässä (MacLachlan ja Dubovi 2011, Sykes 2014). Oireita ovat muun muassa erilaiset tasapaino-ongelmat ja ylikorostuneet kävelyliikkeet (MacLachlan ja Dubovi 2011). Pentujen mentaalistatus ja ruokahalu ovat muuten normaalit. Myös isoavovaurioiden oireita, kuten kohtauksia ja käytösmuutoksia, voi esiintyä. FPV voi aiheuttaa silmämuutoksia, esimerkiksi verkkokalvon kehityshäiriöitä sekä näköhermon hypoplasiaa (Sykes 2014).

FPV:n DNA:ta on löydetty sydänlihaksesta kissoilta, joiden on todettu sairastavan restriktiivistä, hypertrofista tai dilatoivaa sydänlihassairautta eli kardiomyopatiaa ja onkin epäilty, että FPV voisi olla osallisena näissä sairauksissa (Sykes 2014). McEndafferin ym. (2017) tehdyssä uusimmassa tutkimuksessa ei löydetty yhteyttä endomyokardiaalisen restriktiivisen kardiomyopatian ja sydänlihaksesta löydetyn FPV:n DNA:n välillä, mutta laajempia tutkimuksia aiheesta tarvitaan.

FPV voidaan todeta ulosteesta kaupallisesti saatavilla pikatesteillä, jotka ovat kehitetty tunnistamaan koirien parvoviruksen antigeenia (Neuerer ym. 2008, Abd-Eldaim ym. 2009). Testin herkkyys ja spesifisyys vaihtelevat riippuen infektion vaiheesta. Testi voi olla virheellisesti negatiivinen, jos kissa ei eritä virusta tutkimushetkellä (Sykes 2014). Lähiaikoina annettu rokotus elävällä parvovirusrokotteella voi aiheuttaa positiivisen virhetuloksen (Neuerer ym. 2008). Positiivinen tulos yhdessä kliinisten oireiden kanssa on yleisesti ottaen luotettava (Abd-Eldaim ym. 2009). Kissaruton serologista testausta, joka havaitsee FPV:n vasta-aineita verestä, ei suositella, koska sen avulla ei pystytäkään

erottamaan, onko kissa rokotettu vai onko sillä tartunta. Serologiaa voidaan käyttää rokotustarpeen arviointiin (Sykes 2014). Costa Ricassa tehdyssä tutkimuksessa kissoista 92,8 prosentilla oli vasta-aineita FPV:tä vastaan, mutta vain 17,8 prosenttia näistä kissoista olivat aikaisemmin rokotettuja (Blanco ym. 2009). Lisäksi jotkut laboratoriot tekevät spesifistä reaaliaikaista PCR-tutkimusta (qPCR) joko verestä tai ulosteesta. Ulostoiden elektronimikroskopointi on edelleen käytössä joissain tutkimuslaitoksissa virusperäisten suolistotulehdusten diagnosoimiseksi (Sykes 2014), mutta on menettänyt tärkeytensä muun muassa PCR-tutkimusten vuoksi (Truyen ym. 2009). Viruksen eristäminen kissan soluista on haastavaa eikä ole yleisessä käytössä. FPV voidaan todeta myös raadonavauksen yhteydessä otetuista histopatologisista näytteistä immunohistokemiallisilla menetelmillä (Sykes 2014).

Kissaruttotartuntaa epäiltäessä kissa tulisi eristää (Truyen ym. 2009). Tukihoito on ensisijaista sairauden hoidossa, erityisesti suonensisäinen nestehoito ja tarvittaessa oksennuksenestolääkitys (Sykes 2014). Sepsiksen estäminen on tärkeää ja siihen käytetään laajakirjoisia antibiootteja gram-negatiivisia sekä anaerobisia bakteereita vastaan. Antibiootit tulisi mieluiten antaa laskimonsisäisesti. Hypoproteinemiset eli veren proteiinien vähyydestä kärsivät kissat voivat tarvita plasmaa tai verensiirtoa verenpaineen turvaamiseksi (Truyen ym. 2009). Kissat, jotka selviytyivät ensimmäisten 5 päivän ajan hoidon alettua, toipuivat yleensä. Taudista selvinneiden kissojen on oletettu saavan elinikäisen immuniteetin kissaruttoa vastaan (Sykes 2014).

Kissan istukka estää suurimman osan emon vasta-aineiden pääsystä sikiöön. Tästä johtuen riittävällä ternimaidon saannilla on suuri vaikutus maternaalisten vasta-aineiden pitoisuuksiin. Pentueen sisällä voi esiintyä suurta vaihtelua vasta-ainetasojen välillä riippuen saadusta ternimaidon määrästä. Pentujen immuunipuolustus on heikoimmillaan 8-12 viikon ikäisinä, jolloin emältä saadut vasta-aineet ovat liian matalia estämään infektiota, mutta silti riittävän korkeita, että pystyvät häiritsemään rokotuksesta saatavan immuniteetin kehittymistä (Truyen ym. 2009).

Markkinoilla on saatavilla kissaruttoon hyvin tehoavia rokotteita (Sykes 2014) ja kaikki terveet kissat tulisi rokottaa FPV:tä vastaan. Immuunivajavaisten kissojen kohdalla tilannetta tulee harkita tapauskohtaisesti ja kissan terveydentila huomioon ottaen (Truyen ym. 2009). Suomessa kissaruttorokotus kuuluu perusrakotteisiin ja tautitapauksissa on yleensä kyse yksilön puutteellisesta rokotesuojasta (Evira 2017a).

Elintarviturvallisuusvirasto Evira ohjeistaa kertarokotuksen kissaruttoa vastaan yli 12 viikon ikäisille pennuille. Jos pennut rokotetaan ennen 12 viikon ikää, tulee tehosterokotus antaa 12-16 viikon iässä (Evira 2017b). Suomessa käytettävien rokotteiden valmisteyhteenvedon mukaan perusrokotukseen kuuluu kaksi rokotusta noin kuukauden välein. Perusrokotuksessa on mukana suoja kissaruttoa sekä kissaflunssia (herpes- ja kalikivirus) vastaan (EMA 2018, Fimea 2018). Elävää kissaruttorokotetta ei saa käyttää tiineille kissoille eikä käyttöä suositella pienillä pennuilla (Evira 2017b). Tällä hetkellä Suomen markkinoilla on käytössä vain elävää FPV:tä sisältäviä rokotteita (Evira 2017b, EMA 2018, Fimea 2018). Paikoissa, joissa esiintyy suuri tautipaine, laaditaan rokotusohjelma yhdessä eläinlääkärin kanssa (Evira 2017b). Kissarutto kuuluu Suomessa ilmoitettaviin eläintauteihin (MMM 1010/2013). Vuonna 2016 ilmoitettiin 14 kissaruttotapausta (Evira 2018a) ja vuonna 2017 tammi-kesäkuun välillä yksi tapaus (Evira 2018b).

2.1.2 Koronavirus

Koronavirukset ovat vaipallisia, yksijuosteisia RNA-viruksia, joilla on suurin tunnettu RNA-virusten genomi (Addie ym. 2009, Sykes 2014). Kissojen koronavirukset luokitellaan antigeeni- ja perimäominaisuuksien perusteella koronavirusten ryhmä 1a:han (Addie ym. 2009), johon kuuluvat myös esimerkiksi koirien enteerinen koronavirus ja porsaiden respiratorinen koronavirus (Addie ym. 2009, Sykes 2014). Kissojen koronavirusten ei ole todettu tarttuvan ihmiseen. Kissojen koronaviruksista on tunnistettu kaksi eri serotyyppiä, tyyppi I ja II. Serotyypit käyttävät eri reseptoreja solun sisälle pääsemiseksi, mutta aiheuttavat samanlaiset kliiniset oireet (Sykes 2014). Serotyyppiä I esiintyy maailmanlaajuisesti (Addie ym. 2009, Sykes 2014). Serotyyppi II vaikuttaa olevan geneettinen yhdistelmä serotyyppi I:stä ja koirien koronaviruksesta. Tutkimukset ovat keskittyneet enemmän tyyppi II:een, koska sitä on helppo kasvattaa soluviljelmissä (Addie ym. 2009, Sykes 2014, Tekelioglu ym. 2015).

Usein kissojen koronavirukset aiheuttavat vain lievää suolistotulehdusta, mutta osalle kissoista kehittyy tarttuva vatsakalvontulehdus (FIP), joka on vakava systeeminen sairaus ja johtaa aina kuolemaan (Sykes 2014). Suurin osa FIP:iin sairastuneista kissoista on alle vuoden ikäisiä (Addie ym. 2009, Riemer ym. 2016) ja FIP onkin yleinen nuorten kissojen kuolinsyy. Sairautta tavataan myös yleisesti yli 10-vuotiailla kissoilla,

johon syynä on todennäköisimmin elimistön puolustuskyvyn heikkeneminen ikääntymisen myötä (Sykes 2014).

Eniten koronavirustartuntoja esiintyy monikissatalouksissa, kuten rotukissojen kasvattajien kissaloissa, tai eläinsuojissa (Cave ym. 2004, Sykes 2014). Tartuntoja esiintyy kaiken rotuisilla kissoilla, mutta erityiset rotukissat ovat herkkiä tartunnalle (Pesteanu-Somogyi ym. 2006). Myös tietyt rotulinjat saattavat olla alttiimpia kuin rotu itsessään. Kissat, joiden sisarukset ovat kuolleet FIP:iin, saattavat olla suurentuneessa riskissä sairastua, mutta geneettinen alttius sairastumiselle on edelleen epäselvä (Sykes 2014). Turkissa tehdyssä epidemiologisessa tutkimuksessa kulkukissoissa havaittiin olevan vähemmän seropositiivia kissoja kuin kotikissoissa. Tekelioglu ym. (2015) pohtivat tämän johtuvan muun muassa siitä, että kulkukissat eivät käytä hiekkalaatikoita eivätkä välttämättä altistu yhtä helposti koronavirustartunnalle kuin sisällä yhdessä asuvat kissat (Tekelioglu ym. 2015).

Monikissatalouksissa koronavirustartuntaa voidaan tavata jopa kaikilla yksilöillä (Sykes 2014). Tutkimuksissa FIP:n kehittyminen koronavirustartunnasta on kuitenkin tyypillisesti vain noin 12 prosenttia (Addie ym. 2009). Usein FIP onkin yksittäinen tautitapaus eikä leviä kissasta toiseen (Sykes 2014). Kissojen koronavirus voi selviytyä kuivassa ympäristössä jopa 7 viikkoa, mutta tuhoutuu helposti puhdistus- ja desinfektioaineilla. Virus voi säilyä ja levitä fomiittien välityksellä esimerkiksi kissanäyttelyissä puutteellisen desinfioinnin vuoksi (Addie ym. 2009).

FIP:n patogeneesi ja epidemiologia eivät ole vielääkään täysin tiedossa. Yleinen teoria sairastumiselle on se, että kissat altistuvat vähäpatogeeniselle koronavirukselle, josta seuraa oireeton tai lievä suolistotulehdus (Sykes 2014). Tämän tartunnan myötä joillakin yksilöillä virus mutatoituisi kannoiksi, jotka pystyisivät lisääntymään myös makrofageissa ja lopulta aiheuttamaan systeemisen sairastumisen eli FIP:n (MacLachlan ja Dubovi 2011, Sykes 2014). Viruksen mutatoituminen voi tapahtua nopeasti alkuperäisen tartunnan jälkeen tai vuosia myöhemmin, mikä voisi selittää yksinasuvien kissojen FIP-sairastumiset vasta vuosien päästä uuteen kotiin muuton jälkeen. FIP:iä aiheuttavat kannat eivät todennäköisesti pysty lisääntymään suolistossa, mikä voi olla syynä siihen, ettei kissojen välisiä FIP-tartuntoja esiinny (Sykes 2014).

Suuret kissaryhmät, leikkaukset ja kuljetukset voivat aiheuttaa kissoille stressiä ja heikentää täten immuunipuolustusta (Sykes 2014, Tekelioglu ym. 2015). Stressiä ja mahdollisia geneettisiä tekijöitä samanaikaisen koronavirustartunnan kanssa pidetään altistavina tekijöinä FIP:lle. Myös kissaloihin saapuvat uudet kissat ja useat oireettomat kantajat ovat riskitekijöitä (Sykes 2014). Tutkimuksissa ei ole löydetty yhtä erillistä mutaatiota, joka selittäisi viruskannan muuttumisen FIP:iä aiheuttavaksi (Sykes 2014, Barker ym. 2017). Tästä johtuen ei ole olemassa diagnostista testiä, joka pystyisi erottamaan FIP:iä aiheuttavat kannat muista kissan koronavirusten kannoista. Pidetään kuitenkin mahdollisena, että mutaatiot esimerkiksi solukalvojen geeneissä tai viruskantojen yhdistyminen yhdistettynä yksilön geneettiseen alttiuteen sekä otolliseen ympäristöön ovat osasyynä FIP:n syntyyn (Sykes 2014).

Kissat saavat koronavirustartunnan feko-oraalisesti, kun ulosteesta peräisin olevia viruksia päätyy kissan suuhun joko suoraan tai kontaminoituneiden fomiittien välityksellä (Sykes 2014). Yhteisiä hiekkalaatikoita pidetään ensisijaisina tartunnan lähteinä. Terveillä kissoilla esiintyy koronavirusta harvoin syljessä, joten kissojen läheiset välit ja toistensa peseminen tai yhteiset ruokakupit ovat vain vähäinen riski sairastumiselle (Addie ym. 2009). Suurin osa virustartunnan saaneista kissoista pysyy terveisinä tai ne sairastuvat vain lievään suolistotulehdukseen virusten lisääntyessä suolistossa (Addie ym. 2009, Sykes 2014). Harvoissa tapauksissa esiintyy oksentelua ja ruokahaluttomuutta. Myös lieviä ylähengitysoireita on raportoitu kissojen koronavirustartuntojen yhteydessä. Yleensä viruseritys ulosteisiin alkaa noin viikon sisällä tartunnasta ja voi jatkua pisimmillään kuukausia (Sykes 2014). Kissa voi myös jäädä viruksen oireettomaksi kantajaksi, jolloin suuria määriä virusta erittyy jatkuvasti ulosteisiin (Addie ym. 2009).

FIP:iä aiheuttavat viruskannat replikoituvat monosyyteissä sekä makrofageissa ja leviävät systeemisesti verenkierron kautta eri puolelle elimistöä (Sykes 2014). Sairautta on olemassa kahta kliinistä muotoa, joiden kehittymisen on ajateltu riippuvan soluvälitteisen immuunivasteen voimakkuudesta. On ajateltu, että kissat jotka kehittävät vahvan soluvälitteisen immuunivasteen, eivät kehittäisi FIP:iä vaan tartunta olisi havaittavissa pääosin vasta-aineisiin liittyvänä eli humoraalisena vasteena (Addie ym. 2009). Ei-effusiivisessa eli niin sanotussa kuivassa FIP:ssä sairastuneet kissat kehittävät osittaisen soluvälitteisen immuunivasteen, josta seuraa granulomatoottinen tulehdus (Sykes 2014) eli tulehdussolureaktio, jonka solutyypinä ovat pääasiassa

makrofagit. Tulehdussolukertymässä voi lisäksi esiintyä neutrofiilisiä granulosyyttejä, jolloin puhutaan pyogranulomatoottisesta tulehduksesta (Zachary ja McGavin 2013). Granulomatoottista tai pyogranulomatoottista tulehdusta esiintyy useissa elimissä mutta erityisesti suoliliepeen imusolmukkeissa, munuaisissa, maksassa, keuhkoissa, aivoissa ja silmissä (Sykes 2014). Effuusiivista eli FIP:n märkää muotoa esiintyy kissoilla, joilla soluvälitteinen immunitietin vaste on heikko (Addie ym. 2009, Sykes 2014). Oireina ovat elimistön sisäisten kalvojen tulehdus eli polyserosiitti sekä verisuonitulehdus eli vaskuliitti (Addie ym. 2009). Märän muodon tyypillisin oire on rinta- ja vatsaonteloon kertyvä runsasproteiininen, vähäsoluinen tulehdusneste. Nestettä voi kertyä myös vain toiseen onteloista. Infektoituneiden monosyyttien tuottama verisuonten endoteelin kasvutekijä voi johtaa verisuonten lisääntyneeseen läpäisevyyteen ja edesauttaa tulehdusnesteen kertymistä ruumiinonteloihin. Monilla kissoilla nähdään samanaikaisesti sairauden molempia muotoa ja on mahdollista, että kuiva muoto etenee märkään muotoon (Sykes 2014).

Pennut saavat yleensä koronavirustartunnan noin 4-8 viikon ikäisinä maternaalisten vasta-aineiden vähentyessä. FIP:n itämisaika on vaihteleva. Sairaus voi puhjeta muutaman viikon tai vuosien kuluttua. Tyypillisin aika on 6-18 kuukauden kuluttua alkuperäisestä tartunnasta (Addie ym. 2009).

Kliiniset oireet FIP:ssä vaihtelevat sairauden edetessä ja riippuvat elimistä, joissa tartunta on (Sykes 2014). Yleisimmät oireet ovat antibakteeriseen lääkitykseen vastaamaton kuume, väsymys (Tekelioglu ym. 2015, Riemer ym. 2016) sekä ruokahaluttomuus (Riemer ym. 2016). Lisäksi sairaus johtaa painon menetykseen (Tekelioglu ym. 2015, Riemer ym. 2016), mutta usein sairauden alkuvaiheessa kissat ovat kliinisesti hyvässä kunnossa. Nesteen kertyminen vatsaonteloon saatetaan havaita vatsaontelon pullistumisena. Sairailla pennuilla voi esiintyä huonoa kasvua. Keuhkopussiin kertyvä tulehdusneste voi aiheuttaa tihentynyttä hengitystä. Kuivassa muodossa pyogranulomatoottinen tulehdus aiheuttaa kyhmymäisiä eli nodulaarisia muodostelmia eri elimiin, josta voi aiheutua muun muassa ripulia, keuhkokuumetta eli pneumoniaa, suonikalvoston tulehdusta eli uveiittia tai erilaisia keskushermosto-oireita (Sykes 2014).

FIP:iä epäiltäessä diagnoosi tehdään kissan historian sekä kliinisten oireiden perusteella ja sulkemalla pois muita sairauksia (Sykes 2014). FIP:n kuiva muoto on

yleensä hankalampi diagnosoida moninaisten oireiden vuoksi. Varma diagnoosi FIP:stä saadaan ainoastaan havaitsemalla koronaviruksen antigeeneja immunohistokemiallisella värjäyksellä kudospäätteestä (Addie ym. 2009). Kudospäyte tulisi ottaa paikasta, joissa on havaittu pyogranulomatoottisia tai granulomatoottisia muutoksia (Sykes 2014). Sopivien oireiden ja positiivisten antigeenitulosten kanssa FIP:n diagnoosi on lähes varma (Addie ym. 2009). Koepalojen otto ei välttämättä ole mahdollista kissan huonon kunnon vuoksi, jolloin diagnoosiin pääseminen sairaalta kissalta on usein haastavaa tai jopa mahdotonta (Addie ym. 2009, Sykes 2014). Usein koepalat saadaan otettua vasta raadonavauksen yhteydessä (Sykes 2014). Effuusiivisessa muodossa tulehdusnesteen kerääminen tutkittavaksi rinta- tai vatsaontelosta on yleensä helppoa ja neste auttaa sairauden diagnosoinnissa. Tulehdusnesteen makrofageista voidaan immunofluoresenssimenetelmällä havaita koronaviruksen antigeeneja. Ainoastaan FIP:iä sairastavilla kissoilla on tarpeeksi antigeeneja, jotta värjäyksen tulos olisi positiivinen, jolloin menetelmää pidetään luotettavana sairauden diagnosoimiseksi yhdessä muiden oireiden ja löydösten kanssa (Addie ym. 2009). Verinäytteistä voidaan myös tunnistaa koronaviruksen vasta-aineita immunofluoresenssin tai viruksen neutralisaation avulla, jossa vasta-ainetasoa määrätään sen kyvyllä neutraloida virusta. Kissan korkeat vasta-ainetasot eivät kerro yksilön FIP-statuksesta, vaan eläimen altistumisesta jollekin koronavirukselle elämänsä aikana. Lisäksi vasta-aineet saattavat hävitä pitkäaikaisessa sairaudessa, koska elimistö ei pysty enää tuottamaan niitä immuunivasteen heikentyessä. Kuitenkin korkeiden vasta-ainetasojen yhdessä sopivien oireiden kanssa on huomattu tutkimuksessa tukevan FIP:n diagnoosia (Sykes 2014). RT-PCR eli käänteistranskriptiopolymeraasiketjureaktiota voidaan käyttää koronaviruksen havaitsemiseen verestä. Menetelmällä ei kuitenkaan pystytä erottamaan, onko kyseessä FIP:iä aiheuttava kanta, jolloin RT-PCR positiivisia tuloksia voidaan saada myös FIP-negatiivisilta kissoilta (Addie ym. 2009, Sykes 2014). Kissakasvattajat voivat käyttää hyödyksi ulosteesta tehtävää RT-PCR:ää löytääkseen koronaviruksen erittäjiä, mutta tämä vaatii useita näytteenottoja ollakseen luotettava (Sykes 2014).

FIP:iin ei ole parannuskeinoja vaan se johtaa poikkeuksetta kuolemaan. Hoidon tarkoituksena on lisätä elinaikaa ja parantaa elämänlaatua. Suurin osa märkään muotoon sairastuneista kuolee viikoissa. Kuivassa muodossa elin aika voi olla

kuukausia (Sykes 2014). Barkerin ym. (2017) tekemässä tutkimuksessa sairastuneiden kissojen mediaani-ikä eutanasiaalle oli 9 kuukautta.

Jos talouden ainoa kissa kuolee FIP:iin, tulisi odottaa vähintään kaksi kuukautta ennen uuden kissan tuloa taloon, jotta ympäristössä mahdollisesti olevat virukset ovat tuhoutuneet (Addie ym. 2009). Rotukissojen kasvattajille tulisi aina kertoa, jos heidän kasvateillaan todetaan FIP. Taloudessa asuvat muut kissat todennäköisimmin kantavat koronavirusta, mutta eivät välttämättä eritä sitä ympäristöön. Ennen uuden kissan hankintaa olisi suositeltavaa keksiä keinoja stressin vähentämiseksi sekä puuttua tilanahtauteen, jos kissoja on liikaa (Sykes 2014). Hygieniasta huolehtiminen voi vähentää riskiä viruksen leviämiseen. Hiekkalaatikot tulee pitää puhtaina ja ne tulisi pitää eri paikassa kuin missä kissat syövät (Addie ym. 2009). Olisi suositeltavaa välttää siitoskissojen käyttöä, joiden pennut ovat kuolleet FIP:iin (Sykes 2014).

Eviran mukaan FIP on erittäin merkittävä suomalaisten kissojen kuolinsyy ja koronavirusinfektio on todennäköisimmin yleisin virusinfektio suomalaisilla kissoilla (Evira 2018c).

2.1.3 Leukemiavirus

Kissojen leukemiavirus (FeLV) on vaipallinen RNA-virus, joka on *Retroviridae*-heimoon kuuluva gammaretrovirus (MacLachlan ja Dubovi 2011, Sykes 2014). Virus säilyy huonosti kissan ulkopuolella ja tuhoutuu helposti pesu- ja desinfektioaineilla. Toinen retroviruksiin kuuluva kissan immuunikatovirus (FIV) voi aiheuttaa myös ruoansulatuskanavaoireita (Sykes 2014). FIV-tartuntaa käsitellään kappaleessa 2.1.4. FeLV:n aiheuttamaa sairautta kutsutaan kissojen leukoosiksi (Sykes 2014). Kahden viimeisen vuosikymmenen aikana FeLV-tartunnat ovat selvästi vähentyneet kissojen testaamisen ja rokotusten ansiosta (Gleich ym. 2009, Sykes 2014), mutta virus on edelleen merkittävä kotikissojen kuolinsyy maailmanlaajuisesti (Sykes 2014).

Virus jaetaan eri ryhmiin (FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C, FeLV-T), joiden taudinaiheutuskyky vaihtelee (MacLachlan ja Dubovi 2011, Sykes 2014). FeLV leviää pääasiallisesti syljen mukana, jolloin tartunnan voi saada yhteisistä ruoka- ja juomakupeista (Sykes 2014) tai kissojen pestessä toisiaan (Lutz ym. 2009, Sykes 2014). Tartunta voi siirtyä myös tappeluissa kissojen puremien kautta, verensiirrossa, maidon tai kirppujen välityksellä (Sykes 2014). FIV-positiiviset, leikkaamattomat,

ulkoilevat uroskissat, jotka tapaavat toisia kissoja ja käyttäytyvät aggressiivisesti, ovat suuremmassa riskissä saada tartunnan (Gleich ym. 2009, Sykes 2014).

FeLV-tartunnoissa tavataan useita erilaisia kliinisiä tautimuotoja riippuen viruksen ryhmästä, tartuntareitistä ja yksilön immuunistatuksesta. Nenänielun kautta saatu tartunta johtaa viruksen lisääntymiseen alueen imukudoksessa sekä leviämiseen verisuonistossa monosyyttien ja lymfosyyttien välityksellä (MacLachlan ja Dubovi 2011, Sykes 2014). Valkosolujen välityksellä virus päätyy luuytimeen, josta se alkaa levitä elimistön imusolmukkeisiin sekä epiteelisoluihin. Sylkirauhasten epiteelisolujen tartunta johtaa viruksen runsaaseen eritykseen syljen mukana (Sykes 2014). Virusta voi esiintyä myös virtsassa (Sykes 2014) ja ulosteissa (Lutz ym. 2009, Sykes 2014).

Joillakin kissoilla immuunipuolustus pystyy eliminoimaan viruksen tartunnan jälkeen ennen kuin luuydin on infektoitunut (Sykes 2014). Näillä kissoilla puhutaan regressiivisestä tartunnasta, jolloin virusta esiintyy DNA-muodossa isäntäsolun genomissa eli proviruksena mutta kissalla ei esiinny viremiaa eikä kissa eritä virusta (MacLachlan ja Dubovi 2011, Sykes 2014). Regressiivisessä muodossa kissalla ei välttämättä ole ollut viremiaa tai se on ollut lyhytkestoinen (Sykes 2014). Kissa voi elää oireettomana tartunnan kanssa koko eliniän (Lutz ym. 2009, Sykes 2014). On kuitenkin mahdollista, että virus aktivoituu myöhemmin johtuen esimerkiksi tiineydestä tai immuunisuppressiivisesta lääkityksestä. Abortoitavassa muodossa virus eliminoidaan heti tartunnan jälkeen, jolloin ei esiinny viremiaa eikä luuytimen infektoitumista. Abortoitavassa muodossa virus ei ole havaittavissa millään testeillä. Paikallisessa tartunnassa provirusta voidaan havaita joistain kudoksista, mutta ei verestä ja luuytimeestä. Etenevästä tartunnasta puhutaan, kun kissan immuunipuolustus ei pysty eliminoimaan virusta. Tartunta johtaa luuytimen ja verisolujen esiasteiden tartuntaan, minkä seurauksena on jatkuva viremia ja viruksen erityys (Sykes 2014).

Yleisimmät sairaudet, joihin FeLV-tartunta altistaa ovat non-regeneratiivinen anemia ja lymfooma (Lutz ym. 2009, Sykes 2014). Immuunipuolustuksen heikentyessä, kissa on herkempi bakteeritartunnoille, jotka voivat aiheuttaa tulehduksia esimerkiksi virtsatai hengitysteissä. Harvinaisempana oireena FeLV-tartunta voi johtaa suolistotulehdukseen, joka vastaa kliinisesti sekä histologisesti FPV-tartuntaa paitsi imukudoksen tuhoa ei tapahdu. Kliinisiä oireita ovat muun muassa oksentelu, ripuli, ruokahaluttomuus, kuivuminen ja painonlasku (Sykes 2014).

FeLV:n diagnoosiin tulisi käyttää testiä, joka havaitsee viruksen liukoisen p27 proteiiniantigeenin verestä, esimerkiksi entsyymi-immunologinen määrittely (ELISA) tai immunokromatografinen testi (Lutz ym. 2009, Sykes 2014). Tutkimuksissa testit ovat havaittu luotettavaksi ja ovat helposti tehtävissä esimerkiksi käytännön praktiikassa (Gleich ym. 2009, Sykes 2014, Levy ym. 2017). Kuitenkin positiivinen testitulos tulisi aina varmistaa myös toisella menetelmällä. Positiiviset kissat tulisi testata uudelleen 1-3 kuukauden kuluttua, koska kissa voi myös parantua tartunnasta. Antigeenin vähäisestä määrästä johtuen vääriä negatiivisia tuloksia voi esiintyä, jos tartunta on tapahtunut kuukauden sisällä tai jos kissalla ei ole viremiaa. Lisäksi voidaan käyttää vasta-aineen immunofluoresenssimenetelmää, joka havaitsee punasoluihin kiinnittyneen antigeenin (Sykes 2014). Lisäksi PCR:ää voidaan käyttää viruksen genomien havaitsemiseksi verestä, syljestä tai ulosteesta (Lutz ym. 2009, Sykes 2014). Vasta-ainetestit eivät ole hyödyllisiä taudin diagnosoimiseksi (Sykes 2014).

FeLV-tartunnan aiheuttamia sairauksia ja sekundaarisia bakteeritartuntoja hoidetaan tukihoitoon avulla ja samoilla lääkkeillä kuin FeLV-negatiivisilla kissoilla. Kortikosteroideja suurina annoksina sekä muita immunosuppressiivisia tai luuydinsuppressiivisiä lääkityksiä tulee välttää (Sykes 2014).

FeLV-tartunta diagnosoidaan usein oireettomilta kissoilta seulontatutkimuksissa (Arjona ym. 2000, Sykes 2014). Tartuntojen ehkäisemiseksi oireettomat löytökissat, verenluovuttajat (Sykes 2014) sekä jalostuskissat tulisi testata säännöllisesti (Lutz ym. 2009). FeLV-positiiviset kissat tulisi pitää sisätiloissa. Monikissatalouksissa ja eläinsuojissa tartunnan saanut kissa tulee eristää muista ja kissalla tulisi olla oma hiekkalaatikko sekä ruoka- ja juomakupit (Sykes 2014). Vaikka FeLV-tartunta lyhentää selvästi kissan elinikää (Gleich ym. 2009), positiivinen testitulos yksinään ei ole peruste eutanasiaalle, koska tartunnan saanut kissa voi elää useamman vuoden hyvälaatuista elämää. FeLV:ia vastaan on olemassa rokote, mutta tämä ei anna täydellistä suojaa tartuntaa vastaan (Sykes 2014). Suomesta löytyy rokote FeLV:ia vastaan, mutta se ei kuulu perusrokotukseen (Evira 2017b).

Suomessa on tehty tutkimuksia, joissa on kartoitettu FeLV:n esiintymistä. Katsauksessa (Salin ja Kinnunen 2008) kertovat, että vuosina 1990-1991 suomalaisilta kissoilta löydettiin 2 prosentilla FeLV:n proteiiniantigeenia tutkituista seeruminäytteistä (1713 kpl). Helsingin eläinsuojeluyhdistyksen kissoista vuonna 1990 tutkituista

seeruminäytteistä (196 kpl) FeLV-positiivisia oli 1 prosentti, kun vuonna 2003 (115 kpl) ei yhtään.

2.1.4 Kissan immuunikatovirus

Kissan immuunikatovirus (FIV) on vaipallinen RNA-virus, joka on *Retroviridae*-heimoon kuuluva lentivirus. Toinen ruoansulatuskanavan oireita aiheuttava retrovirus on kissan leukemiavirus (FeLV) (Sykes 2014). FeLV:ia käsitellään kappaleessa 2.1.3. FIV vastaa taudin oireiltaan ihmisten immuunikatovirusta (HIV) aiheuttaen kroonisen tartunnan, joka joillakin kissoilla johtaa vakavaan immuunivajavuustilaan (Sykes 2014). FIV-tartuntaa on käytetty apuna HIV:n tutkimuksissa johtuen niiden samankaltaisuudesta (Elder ym. 2010). FIV:n ei ole todettu aiheuttavan sairautta ihmisille. Retrovirukset selviytyvät vain minuutteja isäntäeläimen ulkopuolella ja tuhoutuvat helposti desinfektioaineilla (Sykes 2014).

FIV:iä eritetään runsaasti sylkeen ja yleisin tapa leviämislle on puremat. Virus ei tartu herkästi hiekkalaatikoiden tai ruokakuppien välityksellä (Sykes 2014). Useissa tutkimuksissa FIV-positiivisuus on yhdistetty aikuisiin uroskissoihin (Levy ym. 2006, Gleich ym. 2009, Stavisky ym. 2017), jotka ulkoilevat vapaasti (Levy ym. 2006, Gleich ym. 2009).

Taudin kliiniset oireet etenevät kolmessa vaiheessa (MacLachlan ja Dubovi 2011, Sykes 2014). Akuutti vaihe on usein oireeton tai oireet ovat lieviä. Havaittuja oireita ovat muun muassa imusolmukkeiden suurentuminen, kuume, ruokahaluttomuus, ripuli ja painon lasku. Subkliinisessä vaiheessa viruksen määrä pysyy vähäisenä kissan pysyessä oireettomana vuosia tai jopa koko eliniän (Sykes 2014). Joillakin kissoilla tartunta etenee terminaalivaiheeseen, jolloin kissan elimistön vastustuskyky laskee ja oireena ovat muun muassa erilaiset tulehdukset, joita esiintyy yleisimmin suussa, iholla tai ruoansulatuskanavassa (MacLachlan ja Dubovi 2011, Sykes 2014). Myös erilaisia kasvainsairauksia tai neurologisia oireita voi esiintyä (Sykes 2014).

Monilla kissoilla FIV:n diagnoosi saadaan seulontatutkimuksissa ja diagnoosi perustuu vasta-aineiden osoittamiseen kissan verestä, esimerkiksi ELISA:n avulla (Sykes 2014). Vasta-aineisiin perustuvat testit ovat todettu luotettaviksi ja ovat nopeita ja laajasti saatavilla (Levy ym. 2017). Vääriä negatiivisia tuloksia saattaa esiintyä, jos tartunnasta on alle 2 kuukautta. Vääriä positiivisia tuloksia saattaa esiintyä FIV:iä

vastaan rokotetuilla kissoilla tai pennuilla johtuen maternaalisista vasta-aineista (Sykes 2014). Suosituksena on, että ELISA-testin positiivinen tulos tulisi aina varmistaa esimerkiksi western blot-menetelmällä tai immunofluoresenssin avulla (Levy ym. 2006). Myös PCR-menetelmää voidaan käyttää apuna viruksen genomien havaitsemiseen, mutta se tulisi aina yhdistää serologisiin testeihin johtuen serologisten testien korkeammasta herkkyydestä (Sykes 2014).

Terminaalivaiheen hoitoon kuuluu oireita helpottavat tukihoidot, esimerkiksi nestehoito ja riittävä ravinnosta huolehtiminen. Systeemistä glukokortikoidilääkitystä tulisi välttää, koska se on yhdistetty kohonneeseen plasman viremiaan (Sykes 2014).

Tartunnan ehkäisemiseksi FIV-positiivinen kissa tulisi pitää sisällä. Monikissatalouksissa FIV-positiivisen kissan erityistä muista kissoista tulisi harkita mahdollisuuksien mukaan eikä uusien kissojen hankintaa suositella, koska tämä saattaa lisätä kissojen välistä aggressiivista käyttäytymistä. Kasvatukseen käytettävät kissat ja verenluovuttajat tulisi testauttaa säännöllisesti (Sykes 2014). Tutkimusten perusteella FIV-positiivisten ja negatiivisten kissojen eliniällä ei ole merkittävää eroa (Gleich ym. 2009, Sykes 2014), eikä eutanasiaa tulisikaan suositella pelkän FIV-positiivisuuden vuoksi. FIV:ä vastaan on olemassa rokote, mutta se ei anna täyttä suojaa tartuntaa vastaan. Rokotusten tarvetta arvioidaan aina tapauskohtaisesti (Sykes 2014). Suomessa ei ole markkinoilla rokotetta FIV:iä vastaan (Evira 2017b).

Suomessa FIV:n esiintymisestä on tehty tutkimuksia. Katsauksessa (Salin ja Kinnunen 2008) kertovat, että vuosina 1990-1991 suomalaisilta kissoilta tutkituista seeruminäytteistä (1713 kpl) löydettiin 5 prosentilta FIV:n vasta-aineita. Helsingin eläinsuojeluyhdistyksen kissoista vuonna 1990 tutkituista seeruminäytteistä (196 kpl) FIV-positiivisia oli 6,6 prosenttia, kun vuonna 2003 (115 kpl) määrä oli vain 2,6 prosenttia.

2.1.5 Rotavirus

Rotavirukset ovat *Reoviridae*-heimoon kuuluvia vaipattomia, kaksijuosteisia RNA-virusia (MacLachlan ja Dubovi 2011). Rotaviruksia esiintyy maailmanlaajuisesti ja ovat yleinen syy nuorten nisäkkäiden ja lintujen ruoansulatuskanavan sairauksiin (Hoshino ym. 1981, MacLachlan ja Dubovi 2011). Tartunta vaihtelee oireettomasta vakavaan, jopa kuolemaan johtavaan ripuliin. Rotavirus tarttuu feko-oraalisesti.

Sairastuneet eläimet levittävät virusta runsaasti ulosteissaan, missä virus voi säilyä jopa kuukausia. Rotavirukset kestävät myös hyvin desinfektioaineita (MacLachlan ja Dubovi 2011). Rotavirukset jaetaan lajeihin (A-H) (Phan ym. 2017) vastaa- ainespesifisyyden mukaan. Lisäksi kunkin rotavirustyyppin sisällä virukset jaetaan sero- ja genotyyppeihin (P ja G) uloimpien kapsidiproteiinien (VP7 ja VP4) mukaan (MacLachlan ja Dubovi 2011). Varsinkin rotavirus A on tärkeä taudinaiheuttaja eläimillä ja ihmisillä (Fredj ym. 2013, German ym. 2015). Uudemmissa tutkimuksissa on löydetty uudenlainen rotavirus, jota on alustavasti kutsuttu Rotavirus I:ksi. Kyseinen rotavirusryhmä on löydetty vasta yksittäisiltä koirilta Unkarista sekä kissalta Pohjois- Amerikasta. Viruksen taudinaiheutuskyvyn ja epidemiologian selvitys tarvitsevat lisätutkimuksia (Phan ym. 2017). Rotaviruksen genomi koostuu 11:sta segmentistä, mikä mahdollistaa geneettisen uudelleenjärjestäytymisen ja tekee rotaviruksista geneettisesti monimuotoisia (Palombo 2002). Jos isäntäsolu on infektoitunut useammalla eri genotyypin rotaviruksella, voi syntyä uusia genotyyppiyhdistelmiä (Palombo 2002, Squires 2003). Rotavirusten on todettu siirtyneen eläimiltä ihmisiin, mikä voi aiheuttaa zoonoottisen riskin ihmisille (MacLachlan ja Dubovi 2011). Maailmanlaajuisesti ihmisten rotavirustartunnoissa on havaittu geneettinen yhteys kissojen rotavirukseen (Squires 2003, Tsugawa ja Hoshino 2008, Fredj ym. 2013).

Kissojen rotavirukset voivat muiden rotavirusten tapaa aiheuttaa ripulia pienille pennuille, mutta usein tartunta on lievä tai oireeton (Squires 2003, German ym. 2015). Tämän vuoksi rotavirustartunnan kliinistä merkitystä kissoilla pidetään pienenä (German ym. 2015). Kissojen rotavirustartuntaa vastaan ei ole olemassa rokotetta (Squires 2003). Germanin ym. (2015) Iso-Britanniassa vuonna 2012 tehdyssä tutkimuksessa 3,0 prosenttia ulostenäytteistä (1 727 kpl) oli qPCR-rotaviruspositiivisia, eikä positiivisuus ollut yhteydessä ripulointiin. Kissat olivat uusia koteja etsiviä ja asuivat eläinlaitoksen kaltaisissa paikoissa. Esiintyvyys oli talvella pienempi (0,8 %) kuin kesällä (4,7%) (German ym. 2015).

Diagnostiikka perustuu rotaviruksen löytymiseen ulosteesta. Käytetyimpiä menetelmiä ovat ELISA ja PCR. PCR:n avulla virus voidaan tunnistaa ja genotyyppittää. Myös elektronimikroskopia voidaan käyttää diagnostiikassa, mutta tällöin virusta tulee olla ulosteessa vähintään 10^5 kpl/g (MacLachlan ja Dubovi 2011).

2.1.6 Kalikivirukset

Kalikivirukset ovat geneettisesti monimuotoinen heimo, johon kuuluvat noro-, vesi-, sapo- ja lagovirussuvut. Kalikivirukset ovat vaipattomia, yksijuosteisia RNA-viruksia. Kalikivirustartuntoja tavataan kaikilla eläimillä ja ne aiheuttavat isäntälajista riippuen erilaisia tautimuotoja. Ne kestävät hyvin kuumuutta ja desinfektioaineita (MacLachlan ja Dubovi 2011). Vesi- ja norovirussukuihin liittyviä tartuntoja esiintyy kissoilla (Pinto ym. 2012, Castro ym. 2015).

Ihmisellä norovirus on tyypillinen virusperäisen akuutin suolistotulehduksen aiheuttaja (MacLachlan ja Dubovi 2011). Norovirusta havaittiin ensimmäisen kerran kissaeläimen ulosteesta Italiassa vuonna 2006 vankeudessa eläneeltä leijonanpennulta, jolla oli vakava verinen suolistotulehdus (Martella ym. 2007). Uusia noroviruskantoja on tämän jälkeen löydetty muissakin tutkimuksissa ripuloivien kesykissojen ulosteista. Terveiden kissojen ulosteesta norovirusta ei ole havaittu (Pinto ym. 2012, Castro ym. 2015, Di Martino ym. 2016). Löydetyt kannat ovat vastanneet koirista löydettyjä kantoja (Pinto ym. 2012, Di Martino ym. 2016). Ihmisiä sairastuttavia kantoja ei ole löydetty kissoilta (Di Martino ym. 2016). Tutkimukset antavat näyttöä siitä, että norovirus voi olla mahdollinen syy ruoansulatuskanavaoireisiin myös kissoilla, mutta lisätutkimuksia tarvitaan.

Vesiviruksiin kuuluva kissojen kalikivirus on yleinen maailmanlaajuisesti aiheuttaen tyypillisesti ylähengitystieoireita. Virusta eritetään hengitysteiden, virtsan ja ulosteen kautta. Kalikivirusta esiintyy oireettomien kissojen ulosteissa (Sykes 2014), mutta virusta on löydetty myös ripuloivilta kissoilta (Pinto ym. 2012, Castro ym. 2015). Suolisto-oireiden patogeneesi on epäselvä (Sykes 2014), mutta tutkimusten perusteella kalikivirus voi olla osallisena myös suolistotulehduksissa (Pinto ym. 2012, Castro ym. 2015). Diagnostiikassa kalikivirus voidaan tunnistaa RT-PCR:n avulla sidekalvon tai suun sivelynäytteistä, hengitysteiden huuhtelunäytteistä tai elinnäytteistä (Sykes 2014).

Kalikivirustartuntaa vastaan on olemassa rokote (MacLachlan ja Dubovi 2011, Sykes 2014). Rokotus ei estä infektiota eikä välttämättä suojaa kaikilta oireilta (Sykes 2014). Suomessa tämä kuuluu perusrokotukseen (Evira 2017b).

2.1.7 Astrovirukset

Astrovirukset ovat vaipattomia, yksijuosteisia RNA-viruksia, jotka aiheuttavat ripulitauteja yleisimmin nuorilla lapsilla, mutta astroviruksia esiintyy maailmanlaajuisesti useilla nisäkkäillä ja linnuilla. *Astroviridae*-heimo jaetaan avastrovirus- ja mamastrovirussukuihin, joista kissojen astrovirus kuuluu jälkimmäiseen. Nuorilla eläimillä yleisin astroviruksen aiheuttama oire on itsestään rajoittuva ripuli. Vanhemmilla eläimillä tartunta on usein oireeton (MacLachlan ja Dubovi 2011).

On epäselvää, aiheuttaako kissojen astrovirus suolistotulehdusta. Useissa tutkimuksissa virusta on löydetty ripuloivien kissojen ulosteesta (Rice ym. 1993, Moschidou ym. 2011, Cho ym. 2014) mutta myös oireettomilta kissoilta (Ng ym. 2014, Cho ym. 2014). Myös yhteistartuntoja muiden ruoansulatuskanavaoireita aiheuttavien virusten kanssa on havaittu (Moschidou ym. 2011, Zhang ym. 2014, Ng ym. 2014). Nisäkkäiden astroviruksia pidetään melko isäntälajispesifisinä (MacLachlan ja Dubovi 2011), mutta kissojen astroviruksen kapsidia koodaavat geenit ovat lähempänä ihmisten astroviruksen geeniä kuin muiden nisäkkäiden. Samankaltaisuus voi kertoa siitä, että astroviruksilla esiintyy lajienvälistä geneettisen materiaalisen yhdistymistä (Jonassen ym. 2001).

Aikaisemmin tutkimuksissa viruksen tunnistamiseksi on käytetty elektronimikroskooppia (Rice ym. 1993). Elektronimikroskoopin avulla astroviruksen tunnistaminen voi olla haastavaa johtuen sen samankaltaisuudesta parvo-, kaliki- ja pikornaviruksiin, mikä voi johtaa vääriin tunnistukseen (Oliver ja Phillips 1988). Nykyisin astroviruksen diagnosoinnissa käytetään ulosteesta tehtävää RT-PCR:ää (MacLachlan ja Dubovi 2011).

2.1.8 Adenovirukset

Adenovirukset ovat kaksisäikeisiä, vaipattomia DNA-viruksia. Useat adenovirukset aiheuttavat akuutteja hengitystie- tai suolistotauteja, joiden vakavuus vaihtelee. Adenovirukset ovat melko isäntälajispesifisiä. Poikkeuksena on koiran adenovirus 1, joka aiheuttaa tartuntaa myös susilla, karhuilla ja ketuilla. Lintujen ja koirien adenovirustartuntoja pidetään merkittävimpinä taudin vakavuuden vuoksi. *Adenoviridae*-heimoon kuuluvat aviadenovirus-, atadenovirus-, mastadenovirus- ja

siadenovirussuvut. Adenovirukset säilyvät hyvin ympäristössä, mutta tuhoutuvat desinfektioaineilla (MacLachlan ja Dubovi 2011).

Kissoilla adenovirus on tunnistettu FeLV-positiivisen kissan suolistosta otetusta näytteestä elektronimikroskoopin avulla, mutta virusta ei ole tyypitetty (Kennedy ja Mullaney 1993). Kissojen seropositiivisuutta adenoviruksen suhteen on tutkittu USA:ssa ja Euroopassa. Seropositiivisuus vaihteli 10-26 prosentin välillä positiivisuuden ollessa selvästi korkeampi FIV-positiivisilla kissoilla. On siis mahdollista, että immuunipuolustukseltaan heikommat kissat ovat alttiimpia adenovirusinfektioille (Kennedy ja Mullaney 1993, Lakatos ym. 2000). Kissojen omaa adenovirusta ei ole tunnistettu. Lakatosin ym. (2017) tekemässä tutkimuksessa adenovirus eristettiin PCR:n avulla elinpreparaateista kissalta, jolla oli diagnosoitu yleistynyt adenovirusinfektio. Löydetty adenoviruksen genomi ei vastannut aiemmin tunnettuja adenovirusia. Virus on mahdollisesti uusi kissan adenovirus, mutta tämä tarvitsee lisätutkimuksia (Lakatos ym. 2017). Kuitenkaan näissä tutkimuksissa ei ole saatu varmuutta siitä, millainen merkitys adenovirustartunnalla on kissojen suolistotulehduksissa.

2.2 Uuden sukupolven sekvensointitekniikka

Uuden sukupolven sekvensointi (Next Generation Sequencing, NGS) on nykyaikainen tekniikka, joka perustuu miljoonien DNA-fragmenttien rinnakkaissekvensointiin (Illumina 2017). Rinnakkaissekvensointi mahdollistaa yhdellä reaktiolla jopa kokonaisten genomien sekvensoinnin nopeasti ja edullisesti verrattuna aikaisempiin tekniikoihin (Behjati ja Tarpey 2013). Nykyään NGS-tekniikka on maailmanlaajuisessa käytössä (Van Dijk ym. 2014).

NGS-tekniikalla on useita diagnostisia sovellutuksia. Sitä voidaan käyttää esimerkiksi mikrobien tunnistuksessa, koko genomin sekvensoinnissa tai eksomisekvensoinnissa, jossa analysoidaan ainoastaan eksonit eli proteiineja koodaavat geenialueet (Behjati ja Tarpey 2013). Menetelmää voidaan käyttää muun muassa uusien tautigeenien tai tautien aiheuttamien genomisten muutosten etsimisessä (Van Dijk ym. 2014).

Kaikissa NGS-tekniikoissa monitoroidaan nukleotidien järjestystä, kun niitä liitetään läpivirtauskammioihin kiinnitettyihin DNA-templaatteihin. Suuria eroavaisuuksia tekniikoiden välillä on siinä, miten templaattit on rakennettu ennen sekvensointia ja

miten sekvenssijärjestys selvitetään (Rizzo ja Buck 2012). Esimerkiksi Illumina-yrityksen käyttämä NGS- tekniikka perustuu liitettävien nukleotidien fluoresoivaan reaktioon. Nukleotidit tunnistetaan liittämishetkellä fluoresoivan värin avulla, jolloin saadaan selville nukleotidijärjestys (Illumina 2017).

2.2.1 Uuden sukupolven sekvensointitutkimukset kissoilla

NGS-tekniikkaa on käytetty kissoihin liittyvissä tutkimuksissa. Terveiden ja iho-ongelmista kärsivien kissojen ihonäytteitä on tutkittu NGS:n avulla, jossa on keskitytty sienten genomin havaitsemiseen. Tutkimuksessa havaittiin, että saadut tulokset vastaavat aikaisempia tutkimustuloksia, jotka on tehty sieniviljelyjen avulla (Meason-Smith ym. 2017).

Myös kissojen suuontelon mikrobistoa on selvitetty NGS-tekniikan avulla. Sturgeonin ym (2014) mukaan aikaisempia kattavia tutkimuksia kissojen suuonteloon mikrobistosta ei ole pystytty tekemään puutteellisista metodeista johtuen, vaikka suun alueen bakteeritulehdukset ovat kissoilla yleisiä. Lisäksi kissan puremat tulehtuvat noin 50 prosentilla ihmisistä. Tutkimuksella havaittiin laajakirjoisempia bakteerisukuja kuin mitä aiemmin viljelyyn perustuvilla menetelmillä on havaittu (Sturgeon ym. 2014).

Kissojen ulosteen viromia on tutkittu NGS:n avulla. Portugalissa tehdyssä tutkimuksessa määritettiin yhden terveen kissan ulosteen viromi, josta löydettiin viisi erilaista viruslajia, joista neljän viruksen geenit poikkesivat runsaasti jo aiemmin löydetyistä viruksista (Ng ym. 2014). Kaliforniassa tehdyssä tutkimuksessa tutkittiin 25 terveen kissan ulosteen viromi, jotka asuivat samassa eläinsuojassa. Ulosteista havaittiin kahdeksan eri virusheimoa, joista neljän viruksen genomi erosi huomattavasti jo tunnetuista virussuvuista (Zhang ym. 2014). NGS:n avulla tehdyt tutkimukset ovat siis selvästi tuoneet lisätietoja kissojen ulosteen sisältämistä viruksista. Tulosten perusteella on havaittavissa, että kissoilla esiintyy oireettomia, jopa aikaisemmin tuntemattomia ruoansulatuskanavan virustartuntoja.

3 TUTKIMUS

3.1 Tutkimusaineisto

Tutkimuksessa analysoitiin yhteensä 15 kpl kissojen ulostenäytteitä. Mukana tutkimuksessa oli 9 eläinsuojeluyhdistyksen kissaa ja 6 lemmikkikissaa. Löytökissojen ulostenäytteet saatiin Helsingin eläinsuojeluyhdistykseltä (Hesy) ja Rekku Rescuelta. Näytteet kerättiin kissoilta syys-, loka- ja marraskuun 2017 aikana hiekkalaatikkojen tyhjennyksen yhteydessä. Näytteiden sekvensointitutkimus suoritettiin loka- ja marraskuun 2017 aikana. Osa näytteistä säilytettiin jääkaapissa muutaman tunnin ajan keräyksen jälkeen, mutta tämän jälkeen tutkimukseen asti kaikki näytteet säilytettiin pakastimessa -20 °C:n lämpötilassa.

Tutkittujen kissojen ikä – ja sukupuolijakauma esitellään taulukossa 1. Lähes kaikkien eläinsuojeluyhdistysten kissojen ikä on arvio. Näytteen keräyksen yhteydessä selvitettiin myös, onko kissalla esiintynyt ruoansulatuskanavaoireilua tai onko kissalla muita todettuja sairauksia. Ruoansulatuskanavaoireisten kissojen oireet esitellään taulukossa 2.

Taulukko 1. Tutkittujen kissojen esitiedot. Sairailla kissoilla tarkoitetaan tässä yhteydessä yksilöitä, joilla on ollut ruoansulatuskanavaoireita.

<u>Eläin</u>	<u>Sukupuoli</u>	<u>Ikä(vuotia)</u>	<u>Muut sairaudet</u>	<u>Eläinsuojeluyhdistyksen kissa</u>
<u>Terveet</u>				
Kissa 1	Naaras	6	Ei	Ei
Kissa 2	Uros	5	Ei	Ei
Kissa 3	Naaras	8	Hammasresorptio ^a	Ei
Kissa 5	Naaras	8+	Kalikivirus ^b	Kyllä
Kissa 13	Uros	1	Ei	Kyllä
Kissa 15	Naaras	3-5	Herpesvirus ^b	Kyllä
Kissa 18	Uros	7	Ei	Ei
<u>Saira</u>				
Kissa 6	Uros	-	Herpesvirus ^b	Kyllä
Kissa 9	Naaras	5-8	Ei	Kyllä
Kissa 17	Naaras	2-3	Allergia ^c	Kyllä
Kissa 19	Naaras	6	Ei	Ei
Kissa 20	Uros	7	Ei	Kyllä
Kissa 21	Naaras	14	Ei	Kyllä
Kissa 22	Naaras	3-5	Ei	Kyllä
Kissa 23	Naaras	0,5	Ei	Ei

^a: Todettu ja diagnosoitu eläinlääkärin tutkimuksessa

^b: Todettu oireiden perusteella, ei ole diagnosoitu testeillä

^c: Voimakas kutina ja ruoansulatuskanavaoireet, epäily ruoka-aineperäisestä allergiasta

Taulukko 2. Ripuloivien kissojen oireet ja niiden kesto.

<u>Eläin</u>	<u>Oire</u>	<u>Kesto</u>
Kissa 6	Voimakas limainen ja verinen ripuli	Oireet loppuneet 2 viikkoa sitten
Kissa 9	Voimakas ripuli	Oireet loppuneet 2 viikkoa sitten
Kissa 17	Ripuli	-
Kissa 19	Ajoittainen löysä uloste	2 viikkoa
Kissa 20	Ripuli	6 kuukautta
Kissa 21	Ajoittainen verta sisältänyt ripuli	2 kuukautta
Kissa 22	Ripuli	3 viikkoa
Kissa 23	Ajoittainen verta ja limaa sisältänyt ripuli	2 kuukautta

3.2 Tutkimusmenetelmät

Näytteiden valmistelussa ja käsittelyssä käytettiin pohjana aikaisemmin julkaistua menetelmää (Conceio-Neto ym. 2015). Jokaisella ulostenäytteellä oli oma putki ja samat työvaiheet suoritettiin kaikille näytteille. Kierrekorkkisiin muoviputkiin lisättiin 500 µl steriiliä fosfaattipuskuroitua fysiologista suolaliuosta (PBS). Putkiin mitattiin ulostetta noin 50 mg:n verran. Ripulinäytteiden kohdalla PBS:n määrää vähennettiin 200 µl:aan ja ulosteen määrää lisättiin, jotta näytteistä ei tulisi liian laimeita ripuliulosteen lisääntyneen veden määrän takia. Näytteet homogenisoitiin MagNA lyser-homogenisaattorilla (Hoffmann-La Roche, Basel, Sveitsi) minuutin ajan (3000 rpm). Homogenisoituja näytteitä sentrifugoitiin 3 minuutin ajan (16100 g). 150 µl näytteistä saatua supernatanttia sentrifugoitiin 0,8 µm polyeetterisulfoni (PES) filterin (Sartorius, Göttingen, Saksa) läpi minuutin ajan (16100 g). Suodatuksella näytteistä saadaan poistettua bakteereja sekä soluja.

Nukleaasikäsittelyn tarkoitus on poistaa näytteistä vapaana olevia nukleiinihappoja, jotka ovat peräisin muun muassa hajonneista soluista ja bakteereista. Suodatetut näytteet käsiteltiin nukleaaseilla lisäämällä 7 µl puskuria (1M Tris, 100 mM CaCl₂, 30 mM MgCl₂, pH=8), 2 µl bentsonaasia ja 1 µl mikrokokkien nukleaasia. Lisäyksen jälkeen näytteet sekoitettiin kevyesti ja inkuboitiin 37 °C:n lämpötilassa kaksi tuntia. Reaktio pysäytettiin lisäämällä näytteisiin 7 µl 10 nM EDTA:ta.

Ekstraktioon kuuluu näytteissä olevien proteiinien ja lipidien hajotus sekä nukleiinihappojen eristäminen seuraavaa työvaihetta varten. Ekstraktio suoritettiin QIAamp viral RNA mini kitin avulla (Qiagen, Hilden, Saksa) ilman kantaja-RNA:ta. Tällä menetelmällä eristyy sekä RNA että DNA. Ekstraktion jokaisen työvaiheen välissä vaihdettiin hanskat. Näytteisiin lisättiin 560 µl AVL-puskuria ja inkuboitiin huoneenlämmössä 10 minuutin ajan. Inkuboinnin jälkeen näytteisiin lisättiin 560 µl absoluuttista etanolia ja sekoitettiin hyvin. Näytteitä pipetoitiin 630 µl kolumniin eli silikageelipylväisiin nukleiinihappojen tartuttamiseksi niihin ja sentrifugoitiin minuutin ajan (6000 g) ja vaihdettiin keräysputki. Vaihe suoritettiin kahdesti. Kolumnin päälle pipetoitiin 500 µl AW1-pesupuskuria ja sentrifugoitiin minuutin ajan (6000 g) ja vaihdettiin keräysputki. Vaihdon jälkeen kolumnin päälle pipetoitiin 500 µl-AW2 pesupuskuria, sentrifugoitiin 3 minuutin ajan (16100 g), vaihdettiin keräysputki ja sentrifugoitiin uudelleen minuutin ajan (16100 g). Kolumnit siirrettiin 1,5 ml:n RNAasi vapaisiin Eppendorf-putkiin. Lopuksi eristetyt nukleiinihapot irrotettiin kolumnista pipetoimalla kolumnin päälle 60 µl AVE-eluintipuskuria ja inkuboitiin minuutin ajan. Inkubaation jälkeen näytteitä sentrifugoitiin minuutin ajan (6000 g).

Nukleiinihappojen amplifikaatiolla eli monistamisella lisätään näytteen geneettistä materiaalia monistamalla DNA:ta PCR:n avulla. Amplifikaatio suoritettiin modifioidulla WTA2-protokollalla complete whole transcriptome amplification kittiä käyttäen (Sigma Aldrich, Saint Louis, Yhdysvallat). Amplifikaatioon vaadittavat sekoitukset valmistettiin puhtaassa laboratoriossa, jotta näytteet eivät kontaminoidu. Näyteputkiin pipetoitiin 0,5 µl library synthesis solutionia, johon lisättiin näytettä 2,8 µl. Putket siirrettiin PCR-laitteeseen ja suoritettiin ajo (95 °C 2 minuuttia, jäähdytys 18 °C:n lämpötilaan). Jäähdytettyihin näytteisiin lisättiin sekoitusta, joka sisälsi 0,5 µl library synthesis bufferia, 0,78 µl RNAasi vapaata vettä ja 0,4 µl library synthesis entsyymiä. Suoritettiin käänteiskopiointi-PCR ajo (18 °C 10 min, 25 °C 10 min, 37 °C 30 min, 42 °C 10 min, 70 °C 20 min, lämpötilan laskeminen 4 °C). Käänteiskopiointi-PCR:n avulla RNA:sta tehdään yksijuosteista DNA:ta, jotta viruksen genomien sekvensointi mahdollistuu. Näytteisiin lisättiin sekoitusta, joka sisälsi 7,5 µl amplifikaatiosekoitusta, 60,2 µl RNAasi vapaata vettä, 1,5 µl WTA dNTP-sekoitusta ja 0,75 µl amplifikaatio entsyymiä. Lisäyksen jälkeen suoritettiin PCR ajo (94 °C 2 min, 94 °C 30 sek, 70 °C 5 min). Lämpötilasykli toistettiin 22 kertaa.

Näytteet puhdistettiin käyttämällä GeneJET PCR purification kittiä (Thermo scientific, Waltham, Yhdysvallat) ja suoritettiin kitin ohjeiden mukaan. Tällä menetelmällä näytteistä saadaan poistettua alle 100 nt:n pituiset DNA:n kappaleet, joita ovat esimerkiksi ylijääneet alukkeet. Näytteisiin lisättiin 75 µl binding puskuria ja 75 µl isopropanolia. Sekoituksen jälkeen koko seos siirrettiin GeneJET-puhdistuskolumniin ja sentrifugoitiin minuutin ajan (17 000 g). Kolumnin läpi tullut neste heitettiin pois. Kolumnin päälle lisättiin 700 µl pesupuskuria ja sentrifugoitiin minuutin ajan (17 000 g). Kolumnin läpi tullut neste heitettiin pois. Tämän jälkeen näyte sentrifugoitiin vielä kerran minuutin ajan (17 000 g). Kolumnit siirrettiin puhtaisiin 1,5 millilitran Eppendorf-putkiin. Nukleiinihapot irrotettiin kolumneista pipetoimalla kolumnien päälle 20 µl eluointipuskuria ja sentrifugoimalla minuutin ajan (17 000 g). Kolumnit heitettiin pois ja Eppendorf-putkissa oli 20 µl näytettä.

Näytteiden konsentraatioiden mittaamiseen käytettiin Qubit:ia ja Qubit dsDNA HS assay kittiä (Thermo scientific), joka sisälsi kaksi standardia (Standardi 1:en konsentraatio 0 ng/ml, Standardi 2:en konsentraatio 100 ng/ml). Mittaamisessa käytetty reagenssi on fluoresoiva molekyyli, joka tarttuessaan kaksijuosteiseen DNA:han alkaa fluoresoida voimakkaasti mahdollistaen konsentraatioiden mittaamisen. Tehtiin sekoitus, jossa jokaiseen näytteeseen tuli 199 µl Qubit dsDNA HS-puskuria ja 1 µl Qubit dsDNA HS-reagenssia. Standardeja mitattiin 10 µl ja näytteitä 2-5 µl. Sekoitusta lisättiin siten, että yhteisvolyymi tutkittavissa putkissa oli 200 µl. Kaikki putket sekoitettiin ja luettiin Qubit-laitteella. Qubit-arvojen avulla laskettiin näytteiden konsentraatiot alla olevan kaavan mukaan.

Näytteen konsentraatio ng/ml = Qubit arvo x (200 / näytteen määrä µl)

Konsentraation laskemisen jälkeen näytteitä alettiin valmistella kirjastoa varten. Tagmentaatiovaiheeseen kuuluu DNA:n pilkkominen entsymaattisesti ja adapterisekvenssien lisääminen syntyneiden DNA-fragmenttien päihin. Seuraavissa reaktioissa adapterisekvensseihin liitetään indeksointiprimetit eli alukkeet, jotka sisältävät näytekohtaiset indeksointisekvenssit sekä tunnistesekvenssit. Tunnistesekvenssit tarttuvat sekvensointireaktiossa läpivirtauskammiossa oleviin vastinpareihin. Kirjaston valmisteluun käytettiin Nextera XT DNA sample preparation kittiä (Illumina, San Diego, Yhdysvallat). Koska osan näytteiden konsentraatiot olivat liian korkeat, tehtiin niistä laimennokset. Laimennoksen jälkeen näytteiden

konsentraatio oli noin 1.2 ng/μl. Laimentamiseen käytettiin 10 M Tris HCL-liuosta (pH=8,0). Näytteitä pipetoitiin 2,5 μl kuoppalevyille. Näytteisiin lisättiin 5 μl tagment puskuria ja 2,5 μl amplicon tagment sekoitusta. Lisäyksen jälkeen näytteille tehtiin lämpökäsittely (55 °C 4 min, jäähdytys 10 °C). Tagmentaatio pysäytettiin lisäämällä näytteisiin 2,5 μl neutralize tagment puskuria. Tagmentoituneeseen DNA:han lisättiin indeksointiprimetit 1 ja 2, molempia 2,5 μl. Lisäksi kaikkiin näytteisiin pipetoitiin 7,5 μl Nextera PCR master mixiä. Suoritettiin PCR-ajo (72 °C 3 min, 95 °C 30 s, 95 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72°C 45 sek, yht. 15 sykliä, jäähdytys 4 °C).

Näytteiden puhdistus tehtiin käyttäen AMPure XP-magneettihelmiä (Beckman Coulter, Brea, Yhdysvallat). Käytetyillä konsentraatioilla vain yli 100 bp:n pituiset DNA:t sitoutuvat magneettihelmiin. Lyhyemmät DNA kappaleet, esimerkiksi primetit, huuhtoutuvat pois etanolipesun aikana. Näytteisiin lisättiin 15 μl AMPurea ja inkuboitiin huoneenlämmössä viisi minuuttia. Tämän jälkeen kuoppalevy siirrettiin magneettitelineen päälle ja kahden minuutin jälkeen näytteistä poistettiin kaikki supernatantti. Jokaiseen näytteeseen lisättiin 200 μl 80% etanolia, inkuboitiin yli 30 sekuntia ja poistettiin kaikki etanoli. Tämä vaihe toistettiin kerran. Näytteet otettiin pois magneettilevyn päältä ja näytteisiin lisättiin 26,5 μl 10 mM Tris-HCL, pH 8.0 liuosta, sekoitettiin hyvin ja annettiin inkuboitua 2 min. Inkubaatioajan jälkeen näytteet siirrettiin uudelleen magneettilevyn päälle ja annettiin vaikuttaa kaksi minuuttia. Näytteistä pipetoitiin 24 μl supernatanttia uusiin RNAasi vapaisiin 1,5 ml:n Eppendorf-putkiin.

Valmiin kirjaston konsentraatio tarkastettiin Qubit:in avulla aikaisemmalla mainitulla tavalla. Nukleinihappoketjujen pituuden arvioimiseksi suoritettiin geelielektroforeesiajo agarosigeelissä ja lisäksi suoritettiin reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR käyttäen NEBNext Library Quant kittiä (New England Biolabs, Ipswich, Yhdysvallat) kitin ohjeiden mukaan. Näytteistä tehtiin kuoppalevyille 1:1 000 ja 1:10 000 laimennokset, joiden tilavuus oli 4 μl. Laimennosnesteinä käytettiin NEBNext Library Quant Dilution puskuria. Lisäksi kuoppalevyille pipetoitiin 4 μl neljää eri standardia, joiden konsentraatiot olivat 10 pM, 1 pM, 0,1 pM ja 0,01 pM. Sekä näytteiden että standardien päälle lisättiin 16 μl NEBNext Library Quant Master Mixiä, joka sisälsi primetit. Suoritettiin qPCR-ajo (95 °C 1 min, 95 °C 15 sek., 63 45 sek.), joka toistettiin 35 kertaa.

Kvantitaatiosta saatujen tietojen perusteella näytteet laimennettiin 2 nM pitoisuuteen ja muodostettiin haluttu yhdistelmäkirjasto. Kirjasto sekvensoitiin Illumina Miseq-

sekvensointilaitteella, jossa käytettiin 300 syklin v2 sekvensointikittiä (Illumina). Kittiä käyttämällä saatiin 150 emäksen parillisia sekvenssejä eli yksittäinen DNA-molekyyli sekvensoitiin kahteen suuntaan.

3.3 Tulokset

Näytteistä saadusta datasta suodatettiin pois huonolaatuiset sekvenssit Trimmomatic-ohjelmalla. Lyhyistä (150 emäsparin) sekvensseistä koostettiin pidempiä yhdistelmäsekvenssejä eli contigeja Velvet de-novo assembly-ohjelmalla. Contigit käännettiin aminohapposekvenssiksi, joille etsittiin samankaltaista sekvenssiä geenipankista Blastp-algoritmilla. Tulokset näytteistä löydetyistä mikrobeista esitellään taulukossa 3.

Taulukko 3. Kissojen näytteistä löydetty mikrobilajit kappalemäärinä.

<u>Eläin</u>	<u>Virus</u>	<u>Bakteeri</u>	<u>Bakteriofaagi</u>	<u>Eukaryootti</u>	<u>Yhteensä</u>
<u>Terveet</u>					
Kissa 1	0	24	0	4	28
Kissa 2	0	30	0	5	35
Kissa 3	0	19	0	6	25
Kissa 5	0	51	6	4	61
Kissa 13	1	36	1	7	45
Kissa 15	0	25	0	2	27
Kissa 18	0	8	0	1	9
<u>Sairaat</u>					
Kissa 6	1	30	5	6	42
Kissa 9	2	40	3	2	47
Kissa 17	0	32	0	3	35
Kissa 19	0	21	0	7	28
Kissa 20	0	27	0	7	34
Kissa 21	0	59	10	13	82
Kissa 22	1	80	5	14	100
Kissa 23	1	48	2	12	63

Tässä työssä oli tarkoitus keskittyä kissan ulosteesta löytyviin viruksiin, joten tuloksissa käsittelemme ainoastaan viruksiin liittyviä sekvenssejä. Löydettyjen virusten nimet perustuvat geenipankkisekvenssien nimiin ja esitellään taulukossa 4.

Taulukko 4. Kissoista löydettyjen virusten nimet sukutasolla perustuen geenipankkisekvenssien nimiin, vastaavuus prosentteina geenipankista löydettyyn sekvenssiin ja lähimpänä oleva virus, jota sekvenssi muistutti.

<u>Eläin</u>	<u>Viruksen nimi (suku)</u>	<u>Vastaavuus (%)</u>	<u>Lähin muistuttava virus</u>	<u>Muuta</u>
Kissa 6	Iridovirus	53 %	Invertebrate iridescent virus 30	-
Kissa 9	Circovirus	42 %	Hermit crab associated circular virus	Tunnistamaton yksijuosteinen DNA-virus
Kissa 13	Protoparvovirus	100 %	Kissan panleukopenia virus	-
Kissa 22	Chlorovirus	43 %	Paramecium bursaria Chlorella virus NYs1	-
Kissa 23	Orthoreovirus	100 %	Muscovy duck reovirus	-

4 POHDINTA

Iridovirus on *Iridoviridae*-heimoon kuuluva vaipallinen, kaksijuosteinen DNA-virus. Iridovirus-heimoon kuuluvat virukset ovat suuri monimuotoinen ryhmä, joka infektoi niveljalkaisia, kaloja, sammakkoeläimiä ja matelijoita (MacLachlan ja Dubovi 2011). Todennäköisesti ulosteeseen päätnyt virus on peräisin ruoasta tai RNA-eristyskolumnista, eikä sillä ole merkitystä ruoansulatuskanavaoireiden aiheuttajana.

Kissasta 9 löydettiin circovirukseen vastaavaa sekvenssiä ja lisäksi tunnistamaton virus, jonka sekvenssi vastasi myös circovirusta. Löydetty sekvenssi oli lyhyt pituudeltaan ja vastasi huonosti tällä hetkellä tunnettuja circovirusia. Circovirukset ovat pieniä, vaipattomia, yksijuosteisia DNA-virusia, joiden tiedetään olevan merkittäviä patogeeneja linnuilla ja sioilla aiheuttaen erilaisia oireita, muun muassa laihtumista, ripulia sekä hengitystieoireita (MacLachlan ja Dubovi 2011). Circovirusten ei tiedetä infektoivan kissoja, mutta Zhangin ym. (2014) tekemässä tutkimuksessa löydettiin ensimmäisen kerran cycloviruksen genomia kissojen ulosteesta. *Circoviridae*-heimoon kuuluva cyclovirus on tunnistettu muun muassa ihmisten ja simpanssien ulosteesta, mutta taudinaiheutuskyky on epäselvä (Li ym. 2010). Circovirukset ovat kestäviä ja sietävät hyvin desinfektioaineita, korkeita lämpötiloja ja pH:n vaihtelua (MacLachlan ja Dubovi 2011).

Circoviruksen diagnostiikassa käytetään apuna PCR:ää, viruksen tai virusantigeenin osoittamista muuttuneista kudoksista esimerkiksi elektronimikroskoopin tai immunohistokemiallisen värjäyksen avulla. Vasta-ainetestit eivät ole luotettavia taudin diagnosoimiseksi, koska infektiot ovat usein subkliinisiä (MacLachlan ja Dubovi 2011). Circovirusten siis tiedetään aiheuttavan ruoansulatuskanavaoireita, joten löydetty virus voi olla aiemmin tunnistamaton kissojen oma circovirus, mutta löydösten varmentamiseksi tarvitsisi tehdä lisätutkimuksia. Epäselväksi jää, mikä merkitys on viruslöydöksellä ja tutkitun kissan ripulilla.

Kissasta 13 saatiin koko kissan panleukopenia viruksen (FPV) genomi. FPV:tä käsitellään kappaleessa 2.1.1. Kyseessä oli eläinsuojeluyhdistyksellä asuva nuori oireeton kissa, jonka tiedetään saaneen yhden rokotuksen kissaruttoa vastaan. Rokotevalmiste eikä rokotuksen tarkka ajankohta ole tiedossa. Löydetty virus ei ollut identtinen rokotteissa käytettyjä viruskantoihin, mutta ero ei ollut suuri. Rokotekannoista ei ole saatavilla geenipankissa kuin kapsidialueen sekvenssit, joten

koko viruksen sekvenssejä ei pystytty vertaamaan toisiinsa. Kissalla voi olla taustalla luonnollinen tartunta tai rokotekannan pitkäaikainen replikoituminen kyseisessä yksilössä, esimerkiksi heikentyneen immuunivasteen vuoksi. Täyttä varmuutta viruksen alkuperästä ei kuitenkaan pystytä sanomaan.

Chlorovirus kuuluu *Phycodnaviridae*-heimoon. Chlorovirukset ovat suuria, kaksijuosteisia DNA-viruksia, joiden tiedetään infektoivan leviä (Kang ym. 2005). Yolkenin ym. (2014) tekemässä tutkimuksessa chlorovirus tyyppi ATCV-1 eristettiin ensimmäisen kerran ihmisen nielusta otetusta näytteestä (Yolken ym. 2014). Chloroviruksilla voisi mahdollisesti olla suurempi isäntälajikirjo kuin mitä tähän asti on tiedetty. Löydetyn virussekvenssin alkuperää voi ainoastaan arvailla. Virus voi olla peräisin kissasta mutta lähteenä voi olla myös esimerkiksi RNA-eristyskolumni. Löydöksellä tuskin on yhteyttä ruoansulatuskanavan oireisiin.

Orthoreovirukset ovat *Reoviridae*-heimoon kuuluvia vaipattomia, kaksijuosteisia RNA-viruksia, joiden tiedetään infektoivan nisäkkäitä sekä lintuja. Kädellisten, kanojen ja kalkkunoiden infektoita pidetään merkittävimpinä, mutta orthoreovirukset voivat aiheuttaa myös muille lajeille eriasteisia hengitystie- tai suolistoinfektioita (MacLachlan ja Dubovi 2011). Tutkitulta kissalta löydetty sekvenssi vastasi täysin sorsalintujen orthoreovirusta, mikä on odottamatonta. Samassa NGS-ajossa oli myös lintunäytteitä, mutta näistä ei kyseistä virusta löytynyt. Kissan ulosteeseen päätnyt virus voisi olla peräisin kanaa tai muuta lintua sisältävästä kissanruoasta. On epätodennäköistä, että kyseinen virus olisi yhteydessä ruoansulatuskanavan oireisiin.

Kyseessä oli ensimmäinen Suomessa tehty kissojen viromia käsittelevä tutkimus. Tutkimuksen tarkoituksena oli ilman ennakko-oletuksia selvittää, mitä viruksia löytyy kissojen ulosteista Suomessa. Alun perin tarkoituksena oli tutkia yhteensä 20 kissan ulostenäytteitä, joista puolet olisivat olleet ripuloivia ja puolet oireettomia, mutta näytteiden määrää vähennettiin johtuen siitä, että näytteitä ripuloivilta kissoilta ei saatu riittävästi. Yhden ihmisen tekemänä ripuloivien kissojen löytäminen oli haastavaa, vaikka yhteistyötä tehtiin useamman pääkaupunkiseudun eläinlääkäriaseman sekä eläinsuojeluyhdistysten kanssa. Lisäksi yksittäisen näytteen tutkiminen maksoi noin 200 euroa, mikä rajoitti jo alun perin tutkittavien näytteiden määrää.

Verrattuna Portugalissa ja Kaliforniassa ulosteista tehtyihin viromitutkimuksiin, jossa löydettiin useampia viruksia pienillä tutkimusmäärillä (Zhang ym. 2014, Ng ym. 2014),

suomalaisten kissojen ulosteista löytyneiden virusten määrä oli selvästi matalampi. Suurempia johtopäätöksiä ei näin pienellä tutkittujen kissojen määrällä pystytäkään tekemään. Yllättävää kuitenkin, että vaikka tutkimuksessa oli mukana useita eläinsuojeluyhdistyksen kissoja, joiden alkuperä ei ole selvillä, ei näilläkään kissoilla esiintynyt merkittäviä virustartuntoja. Tulevaisuudessa samanlainen tutkimus olisi mielenkiintoista tehdä suuremmalla kissamäärällä keräämällä näytteitä eri puolelta Suomea, vertaillen eroavaisuuksia maantieteellisesti sekä sisä- ja ulkokissojen välillä.

NGS:n käyttäminen virusten havaitsemiseen ulosteista vaikuttaisi olevan käyttökelpoinen tutkimusmenetelmä. NGS tulee varmasti tulevaisuudessa edelleen kasvattamaan suosiotaan mikrobien tunnistamisessa erilaisista näytteistä.

KIITOKSET

Haluan kiittää suuresti Helsingin eläinsuojeluyhdistystä, Rekku Rescueta sekä kaikkia yksittäisiä henkilöitä, jotka auttoivat minua ulostenäytteiden saamisessa. Kiitokset myös ohjaajalleni Teemu Smuralle laboratoriotöiden opettamisesta ja kaikesta avusta tutkielmaa kirjoittaessa, johtajalle professori Olli Vapalahdelle mielenkiintoisesta lisenssiaatin tutkielman aiheesta ja koko Meilahden virologian osaston porukalle mukavasta työskentelyilmapiiristä.

5 LÄHDELUETTELO

Abd-Eldaim M, Beall MJ, Kennedy MA. Detection of feline panleukopenia virus using a commercial ELISA for canine parvovirus. *Vet Ther* 2009, 10:E1-E6.

Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lioret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 2009, 11:594-604.

Arjona A, Escolar E, Soto I, Barquero N, Martin D, Gomez-Lucia E. Seroepidemiological Survey of Infection by Feline Leukemia Virus and Immunodeficiency Virus in Madrid and Correlation with Some Clinical Aspects. *J Clin Microbiol* 2000, 38:3448-3449.

Barker EN, Stranieri A, Helps CR, Porter EL, Davidson AD, Day MJ, Knowles T, Kipar A, Tasker S. Limitations of using feline coronavirus spike protein gene mutations to diagnose feline infectious peritonitis. *Vet Res* 2017, 48:9
doi:10.1186/s13567-017-0467-9

Barzon L, Lavezzo E, Costanzi G, Franchin E, Toppo S, Palù G. Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology. *J Clin Virol* 2013, 58:346-350.

Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Childhood-E* 2013, 98:236-238.

Blanco K, Prendas J, Cortes R, Jimenez C, Dolz G. Seroprevalence of viral infections in domestic cats in Costa Rica. *J Vet Med Sci* 2009, 71:661-663.

Castro TX, Garcia, Rita de Cássia N, Fumian TM, Costa EM, Mello R, White PA, Leite JPG. Detection and molecular characterization of caliciviruses (vesivirus and norovirus) in an outbreak of acute diarrhea in kittens from Brazil. *Vet J* 2015, 206:115-117.

Cave TA, Golder MC, Simpson J, Addie DD. Risk factors for feline coronavirus seropositivity in cats relinquished to a UK rescue charity. *J Feline Med Surg* 2004, 6:53-58.

Cho Y, Lim S, Kim YK, Song J, Lee J, An D. Molecular characterisation and phylogenetic analysis of feline astrovirus in Korean cats. *J Feline Med Surg* 2014, 16:679-683.

Conceio-Neto N, Zeller M, Lefrre H, De Bruyn P, Beller L, Deboutte W, Yinda CK, Lavigne R, Maes P, Van Ranst M. Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. *Sci Rep-UK* 2015, 5:16532. doi: 10.1038/srep16532

Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA, Mukha DV, Pintel DJ, Qiu J, Soderlund-Venermo M, Tattersall P, Tijssen P, Gatherer D, Davison AJ. The family parvoviridae. *Arch Virol* 2014, 159:1239-1247.

Decaro N, Buonavoglia D, Desario C, Amorisco F, Colaianni ML, Parisi A, Terio V, Elia G, Lucente MS, Cavalli A, Martella V, Buonavoglia C. Characterisation of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia. *Res Vet Sci* 2010, 89:275-278.

Di Martino B, Di Profio F, Melegari I, Sarchese V, Cafiero MA, Robetto S, Aste G, Lanave G, Marsilio F, Martella V. A novel feline norovirus in diarrheic cats. *Infection, Genetics and Evolution* 2016, 38:132-137.

Elder JH, Lin Y, Fink E, Grant CK. Feline immunodeficiency virus (FIV) as a model for study of lentivirus infections: parallels with HIV. *Curr Hiv Res* 2010, 8:73-80.

EMA 2018. Veterinary Medicines. Purevac RCP product information. http://www.ema.europa.eu/docs/fi_FI/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000090/WC500066647.pdf, haettu 19.2.2018, päivitetty 23.02.2015.

Evira 2017a. Kissarutto. <https://www.evira.fi/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/lemmikkielaimet/kissat/kissarutto/>, haettu 28.12.2017, päivitetty 21.4.2016.

Evira 2017b. Kissarokotteet. <https://www.evira.fi/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/rokoiteneuvonta/elainlajikohtaiset-rokotteet/kissarokotteet/>, haettu 28.12.2017, päivitetty 22.3.2017.

Evira 2018a. Eläintaudit. Eläinlääkärien ilmoittamat eläintaudit Suomessa 2016, kuukausittain. <https://www.evira.fi/globalassets/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/elaintaudit-2016-kuukausittainen-yhteenveto.pdf>, haettu 13.2.2018.

Evira 2018b. Eläintaudit. Eläinlääkärien ilmoittamat eläintaudit Suomessa 1.1.-30.6.2017, kuukausittain. <https://www.evira.fi/globalassets/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/elaintaudit-2017-kuukausittain-1.1.-30.6.2017.pdf>, haettu 13.2.2018

Evira 2018c. Lemmikkieläinten taudit. <https://www.evira.fi/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/lemmikkielaimet/>, haettu 13.2.2018, päivitetty 17.11.2016.

Fimea 2018. Lääkehaut ja luettelot. Eläinlääkkeiden valmisteyhteenvedot. Nobivac Tricat Trio. <http://spc.nam.fi/indox/nam/html/nam/vetspc/5/10969215.pdf>, haettu 19.2.2018.

Fredj MBH, Heylen E, Zeller M, Fodha I, Benhamida-Rebai M, Van Rast M, Matthijnssens J, Trabelsi A. Feline origin of rotavirus strain, Tunisia, 2008. *Emerg Infect Dis* 2013, 19:630-634.

German AC, Iturriza-Gómara M, Dove W, Sandrasegaram M, Nakagomi T, Nakagomi O, Cunliffe N, Radford AD, Morgan KL. Molecular epidemiology of rotavirus in cats in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2015, 53:455-464.

Gleich SE, Krieger S, Hartmann K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *J Feline Med Surg* 2009, 11:985-992.

Hoshino Y, Baldwin CA, Scott FW. Isolation and Characterization of Feline Rotavirus. *J Gen Virol* 1981, 54:313-323.

Illumina 2017. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology.
https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf, haettu 27.12.2017.

Jonassen CM, Jonassen Tø, Saif YM, Snodgrass DR, Ushijima H, Shimizu M, Grinde B. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J Gen Virol* 2001, 82:1061-1067.

Kang M, Dunigan DD, Van Etten JL. Chlorovirus: A genus of Phycodnaviridae that infects certain chlorella-like green algae. *Mol Plant Pathol* 2005, 6:213-224.

Kennedy FA, Mullaney TP. Disseminated Adenovirus Infection in a Cat. *J Vet Diagn Invest* 1993, 5:273-276.

Kruse BD, Unterer S, Horlacher K, Sauter-Louis C, Hartmann K. Prognostic factors in cats with feline panleukopenia. *J Vet Intern Med* 2010, 24:1271-1276.

Lakatos B, Farkas J, Adám É, Dobay O, Jeney C, Nász I, Ongrádi J. Serological evidence of adenovirus infection in cats. *Arch Virol* 2000, 145:1029-1033.

Lakatos B, Hornyák Á, Demeter Z, Forgách P, Kennedy F, Rusvai M. Detection of a putative novel adenovirus by PCR amplification, sequencing and phylogenetic characterisation of two gene fragments from formalin-fixed paraffin-embedded tissues of a cat diagnosed with disseminated adenovirus disease. *Acta Vet Hung* 2017, 65:574-584.

Levy JK, Crawford PC, Tucker SJ. Performance of 4 Point-of-Care Screening Tests for Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus. *J Vet Intern Med* 2017, 31:521-526.

Levy JK, Scott HM, Lachtara JL, Crawford PC. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *J Am Vet Med Assoc* 2006, 228:371-376.

Li L, Kapoor A, Slikas B, Bamidele OS, Wang C, Shaukat S, Masroor MA, Wilson ML, Ndjango JN, Peeters M, Gross-Camp ND, Muller MN, Hahn BH, Wolfe ND, Triki

H, Bartkus J, Zaidi SZ, Delwart E. Multiple Diverse Circoviruses Infect Farm Animals and Are Commonly Found in Human and Chimpanzee Feces. *J Virol* 2010, 84:1674-1682.

Lutz H, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 2009, 11:565-574.

MacLachlan NJ, Dubovi EJ. *Fenner's veterinary virology*. 4. p. Academic Press, Lontoo, Iso-Britannia 2011.

Martella V, Campolo M, Lorusso E, Cavicchio P, Camero M, Bellacicco AL, Decaro N, Elia G, Greco G, Corrente M, Desario C, Arista S, Banyai K, Koopmans M, Buonavoglia C. Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*). *Emerg Infect Dis* 2007, 13:1071-1073.

McEndaffer L, Molesan A, Erb H, Kelly K. Feline Panleukopenia Virus Is Not Associated With Myocarditis or Endomyocardial Restrictive Cardiomyopathy in Cats. *Vet Pathol* 2017, 54: 669-675.

Meason-Smith C, Diesel A, Patterson AP, Older CE, Johnson TJ, Mansell JM, Suchodolski JS, Rodrigues Hoffmann A. Characterization of the cutaneous mycobiota in healthy and allergic cats using next generation sequencing. *Vet Dermatol* 2017, 28:71-81.

MMMa 1010/2013. Maa- ja metsätalousministeriön asetus eläintautien ilmoittamisesta ja mikrobikantojen toimittamisesta.
<https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2013/20131010>, haettu 25.12.2017.

Moschidou P, Martella V, Lorusso E, Desario C, Pinto P, Losurdo M, Catella C, Parisi A, Banyai K, Buonavoglia C. Mixed infection by Feline astrovirus and Feline panleukopenia virus in a domestic cat with gastroenteritis and panleukopenia. *J Vet Diagn Invest* 2011, 23:581-584.

Neuerer FF, Horlacher K, Truyen U, Hartmann K. Comparison of different in-house test systems to detect parvovirus in faeces of cats. *J Feline Med Surg* 2008, 10:247-251.

Ng TFF, Mesquita JR, Nascimento MSJ, Kondov NO, Wong W, Reuter G, Knowles NJ, Vega E, Esona MD, Deng X, Vinje J, Delwart E. Feline fecal virome reveals novel and prevalent enteric viruses. *Vet Microbiol* 2014, 171:102-111.

Oliver AR, Phillips AD. An electron microscopical investigation of faecal small round viruses. *J Med Virol* 1988, 24:211-218.

Palombo EA. Genetic Analysis of Group A Rotaviruses: Evidence for Interspecies Transmission of Rotavirus Genes. *Virus Genes* 2002, 24:11-20.

Pesteanu-Somogyi LD, Radzai C, Pressler BM. Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds. *J Feline Med Surg* 2006, 8:1-5.

Phan TG, Leutenegger CM, Chan R, Delwart E. Rotavirus I in feces of a cat with diarrhea. *Virus Genes* 2017, 53:487-490.

Pinto P, Wang Q, Chen N, Dubovi EJ, Daniels JB, Millward LM, Buonavoglia C, Martella V, Saif LJ. Discovery and genomic characterization of noroviruses from a gastroenteritis outbreak in domestic cats in the US. *PLoS ONE* 2012, 7: e32739. doi: 10.1371/journal.pone.0032739

Rice M, Wilks CR, Jones BR, Beck KE, Jones JM. Detection of astrovirus in the faeces of cats with diarrhoea. *N Z Vet J* 1993, 41:96-97.

Riemer F, Kuehner KA, Ritz S, Sauter-Louis C, Hartmann K. Clinical and laboratory features of cats with feline infectious peritonitis – a retrospective study of 231 confirmed cases (2000–2010). *J Feline Med Surg* 2016, 18:348-356.

Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res* 2012, 5:887-900.

Salin N, Kinnunen P. Kissojen virusinfektioit suomessa. *Kissa: Suomen Kissaliitto SRK R.Y:N Jäsenjulkaisu* 2008, 47:17-20.

Squires RA. An update on aspects of viral gastrointestinal diseases of dogs and cats. *N Z Vet J* 2003, 51:252-261.

Stavisky J, Dean RS, Molloy MH. Prevalence of and risk factors for FIV and FeLV infection in two shelters in the United Kingdom (2011-2012). *Vet Rec* 2017, 181:451. doi: 10.1136/vr.103857

Sturgeon A, Pinder SL, Costa MC, Weese JS. Characterization of the oral microbiota of healthy cats using next-generation sequencing. *Vet J* 2014, 201:223-229.

Sykes JE. *Canine and Feline Infectious Diseases*. 1. p. Elsevier/Saunders, St. Louis, Yhdysvallat 2014.

Tekelioglu BK, Berriatua E, Turan N, Helps CR, Kocak M, Yilmaz H. A retrospective clinical and epidemiological study on feline coronavirus (FCoV) in cats in Istanbul, Turkey. *Prev Vet Med* 2015, 119:41-47.

Truyen U, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Fulvio M, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Horzinek MC. Feline panleukopenia: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 2009, 11:538-546.

Tsugawa T, Hoshino Y. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology* 2008, 380:344-353.

Van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 2014, 30:418-426.

Yang S, Wang C, Wang S, Feng H, Zeng L, Xia X, Xia Z, Zhang R, Zou X, Liu Q. Isolation and characterization of feline panleukopenia virus from a diarrheic monkey. *Vet Microbiol* 2010, 143:155-159.

Yolken RH, Jones-Brando L, Dunigan DD, Kannan G, Dickerson F, Severance E, Sabunciyany S, Talbot CCJ, Prandovszky E, Gurnon JR, Agarkova IV, Leister F, Gressitt KL, Chen O, Deuber B, Ma F, Pletnikov MV, Van Etten JL. Chlorovirus ATCV-1 is part of the human oropharyngeal virome and is associated with changes

in cognitive functions in humans and mice. P Natl Acad Sci USA 2014, 111:16106-16111.

Zachary JF, McGavin MD. Pathologic Basis of Veterinary Disease. Elsevier, St. Louis, Yhdysvallat, 2013.

Zhang W, Li L, Deng X, Kapusinszky B, Pesavento PA, Delwart E. Faecal virome of cats in an animal shelter. J Gen Virol 2014, 95:2553-2564.